

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

KAROLINE TEIXEIRA FERMO

**EFEITOS DA VITAMINA D SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM UM MODELO
ANIMAL DE DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO**

CRICIÚMA

2024

KAROLINE TEIXEIRA FERMO

**EFEITOS DA VITAMINA D SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM UM MODELO
ANIMAL DE DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

CRICIÚMA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F361e Fermo, Karoline Teixeira.
Efeitos da vitamina D sobre parâmetros
comportamentais e neuroquímicos em um modelo animal
de doença da urina do xarope do bordo / Karoline
Teixeira Fermo. - 2024.
69 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul
Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde, Criciúma, 2024.

Orientação: Emilio Luiz Streck.

1. Vitamina D - Uso terapêutico. 2. Doença da
urina do xarope do bordo - Tratamento. 3. Terapia
cognitivo-comportamental. 4. Estresse oxidativo. I.
Título.

CDD 23. ed. 615.328

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

PARECER


No dia 30 (trinta) do mês de abril de 2024, às 14 (quatorze) horas, na Sala 007/Bloco XXI A, após o cumprimento legal de conclusão das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado), realizaram-se a apresentação e a consequente defesa da tese intitulada: “EFEITOS DA VITAMINA D SOBRE NEUROQUÍMICA EM UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO”, da candidata **Karoline Teixeira Fermo**. A Banca examinadora foi composta pelos(as) professores(as): **Dra. Jaqueline da Silva Generoso** (Membro Relator – UNESC), **Dra. Josiane Budni** (Membro Interno – UNESC), **Dra. Fernanda de Oliveira Meller** (Membro Externo – UNESC) e **Dr. Roger Walz** (Membro Externo – UFSC). Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora, que assim expressou o resultado final da tese:

Trabalho aprovado

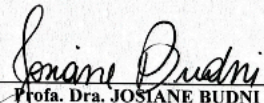
Trabalho não aprovado

Observações:


Criciúma, SC, 30 de abril de 2024.



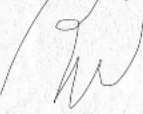
Profa. Dra. JAQUELINE DA SILVA GENEROSO
Membro Relator – UNESC



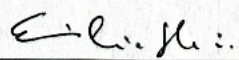
Profa. Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Interno – UNESC



Profa. Dra. FERNANDA DE OLIVEIRA MELLER
Membro Externo – UNESC



Prof. Dr. ROGER WALZ
Membro Externo – UFSC



Prof. Dr. EMILIO LUIZ STRECK
Orientador e Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.
Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biomedicina translacional do
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul
Catarinense.

*“De tudo, ao meu amor serei atento
Antes, e com tal zelo, e sempre, e tanto
Que mesmo em face do maior encanto
Dele se encante mais meu pensamento”*

Vinicius de Moraes

Com amor às pessoas mais importantes da minha vida: minha família.

AGRADECIMENTOS

Hoje com mais maturidade, tenho a certeza de que Deus me permitiu e me sustentou para que eu chegasse até aqui. Afinal, Ele colocou no meu caminho pessoas que me fizeram ser quem eu sou hoje. Eu só posso ser grata por tudo que tenho em minha vida.

Gostaria de dedicar este trabalho aos meus pais, Maria Eliane e Valentin que foram os meus maiores incentivadores a percorrer a jornada do mestrado e doutorado e, que são, os maiores apoiadores dos meus sonhos. Obrigada por serem a minha maior base e o meu suporte. Eu me sinto muito mais forte e corajosa porque tenho o amor de vocês e sei que posso voar mais alto porque os tenho ao meu lado, sempre.

Um agradecimento especial ao meu namorado e companheiro de vida Angelo, que com seu carinho e cuidado foi meu apoiador e amigo. Que possamos dividir muitas conquistas ao longo da vida com muita admiração um pelo outro.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Emílio, por todos esses anos de orientação, por todos os ensinamentos, críticas construtivas e pela compreensão e empatia por uma doutoranda que decidiu trilhar uma nova graduação.

Sou extremamente grata aos colegas de laboratório, em especial à Isabela, que sempre me ajudaram com a rotina de laboratório e parceria deste e de outros trabalhos.

Agradeço aos professores do PPGCS por todos os aprendizados ao longo desses anos e à coordenação que sempre sanou todas as dúvidas.

E por fim, agradeço à Universidade do Extremo Sul Catarinense que foi minha morada por aproximadamente dez anos e que foi a responsável pela minha formação.

Amo vocês!

RESUMO

A doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB) é ocasionada pelo acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina. Além de outros sintomas, apresenta dano neurológico grave, principalmente na aprendizagem e cognição, bem como diminuição do metabolismo energético e estresse oxidativo (EOX). Desta maneira, a vitamina D exerce funções biológicas no sistema nervoso central regulando fatores neurotróficos e neurotransmissores, apresentando características antioxidantes. Visto isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da vitamina D sobre comportamento, memória, sistema colinérgico e parâmetros de EOX em ratos submetidos a um modelo da DXB. Foram utilizados 64 ratos Wistar machos de 7 dias de vida divididos em quatro grupos: controle salina, grupo DXB, grupo vitamina D e grupo DXB-vitamina D. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais de habituação em campo aberto e memória de reconhecimento de objetos. Foi realizada a dissecação do córtex cerebral para posteriores análises bioquímicas. Para análise do sistema colinérgico foi realizada atividade da AChE e ChAT e a avaliação de EOX foi por meio das análises do conteúdo de sulfidrilas, oxidação de DCFH, níveis de TBA-RS e atividades enzimáticas da SOD e CAT. Os resultados mostraram aumento da atividade da SOD no grupo vitamina D salina e DXB + vitamina D comparados ao grupo controle salina e DXB + vitamina D. Já em relação à atividade de CAT percebeu-se diminuição no grupo vitamina D salina e DXB controle quando comparado ao grupo salina controle. No conteúdo de sulfidrilas, a suplementação de vitamina D foi capaz de reestabelecer o conteúdo de sulfidrilas no grupo DXB + vitamina D quando comparado ao grupo DXB controle. Observou-se aumento dos níveis de TBARS no grupo DXB controle quando comparado ao grupo salina controle. A fim de avaliar danos ao DNA, o tratamento com vitamina D, foi capaz de reverter o dano ocasionado pela administração dos AACR no grupo DXB + vitamina D. Quanto à avaliação do sistema colinérgico, a suplementação de vitamina D foi capaz de reverter o aumento de AChE no grupo DXB + vitamina D quando comparado ao grupo DXB controle. Em relação ao teste de habituação em campo aberto os animais não apresentaram alterações locomotoras ou exploratórias. Ainda, no mesmo teste foi possível observar que os grupos vitamina D salina, DXB controle e DXB + vitamina D não apresentaram diferenças na memória de curto e de longo prazo indicando danos a memória de curto e longo prazo desses animais. Logo, embora diversos estudos apresentem dados quanto ao uso da vitamina D sobre EOX, sistema colinérgico e comportamento, esses dados apresentam divergências quanto a idade dos animais, dose e via utilizadas e principalmente, quanto ao mecanismo de ação da vitamina D sobre esses

parâmetros, sendo necessários mais estudos para que se tenha entendimento sobre seus efeitos na DXB.

Palavras-chave: Doença da Urina do Xarope do Bordo; Vitamina D; Comportamento cognitivo; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Maple syrup urine disease (MSUD) is caused by the accumulation of branched-chain amino acids (BCAAs) leucine, isoleucine, and valine. In addition to other symptoms, it presents severe neurological damage, mainly affecting learning and cognition, as well as decreased energy metabolism and oxidative stress. Thus, vitamin D plays a biological role in the central nervous system by regulating neurotrophic factors and neurotransmitters, exhibiting antioxidant characteristics. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of vitamin D on behavior, memory, the cholinergic system, and oxidative stress parameters in rats subjected to an MSUD model. Sixty-four male Wistar rats aged 7 days were divided into four groups: saline control, MSUD group, vitamin D group, and MSUD-vitamin D group. The animals underwent behavioral tests of open-field habituation and object recognition memory. Dissection of the cerebral cortex was performed for subsequent biochemical analysis. For analysis of the cholinergic system, AChE and ChAT activity were measured, and oxidative stress evaluation was conducted through analyses of sulfhydryl content, DCFH oxidation, TBA-RS levels, and enzymatic activities of SOD and CAT. Results showed increased SOD activity in the saline vitamin D group and MSUD + vitamin D group compared to the saline control and MSUD + vitamin D group. CAT activity was decreased in the saline vitamin D group and MSUD control group compared to the saline control group. In terms of sulfhydryl content, vitamin D supplementation restored sulfhydryl content in the MSUD + vitamin D group compared to the MSUD control group. TBARS levels were elevated in the MSUD control group compared to the saline control group. Vitamin D treatment was able to reverse DNA damage caused by BCAAs administration in the MSUD + vitamin D group. Regarding the cholinergic system evaluation, vitamin D supplementation was able to reverse the increase in AChE in the MSUD + vitamin D group compared to the MSUD control group. Open field habituation test indicated no locomotor or exploratory alterations in the animals, respectively. Additionally, in the same test, was observed that the saline vitamin D, MSUD control, and MSUD + vitamin D groups did not show differences in short-term memory and long-term memory, indicating damage to the short-term and long-term memory of these animals. Thus, although several studies provide data on the use of vitamin D on oxidative stress, the cholinergic system, and behavior, these data differ regarding the age of the animals, dose, and route used, and mainly, the mechanism of action of vitamin D on these parameters, necessitating further studies to understand its effects on MSUD.

Keywords: Maple syrup urine disease; Vitamin D; Cognitive Impairment; Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada..	15
Figura 2 - Síntese e metabolismo da vitamina D.....	27
Figura 3 - Modelo experimental	32
Figura 4 - Representação dos crossings e rearings no teste comportamental habituação ao campo aberto	33
Figura 5 - Representação da memória de reconhecimento de objetos	34
Figura 6 - Efeitos da suplementação de vitamina D sobre sistema antioxidante em um modelo animal de DXB. A) Atividade da SOD. B) Atividade da CAT.....	39
Figura 7 - Efeitos da suplementação de vitamina D sobre dano oxidativo em um modelo animal de DXB. A) Oxidação de DCFH. B) Conteúdo de sulfidrilas. C) Níveis de TBARS.....	40
Figura 8 - Efeitos da suplementação de vitamina D sobre ensaio cometa em um modelo animal de DXB.....	41
Figura 9 - Efeitos da suplementação de vitamina D sobre sistema colinérgico em um modelo animal da DXB. A) Atividade da ChAT. B) Atividade da AChE.....	41
Figura 10 - Efeitos da suplementação de vitamina D sobre comportamento de habituação ao campo aberto em um modelo animal de DXB.	42
Figura 11 - Efeitos da suplementação de vitamina D sobre comportamento de reconhecimento de objetos em um modelo animal de DXB.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 1,25(OH)₂D - 1,25-dihidroxitamina D
25(OH)D - 25-hidroxitamina D
AACR - Aminoácidos de cadeia ramificada
ACh - Acetilcolina
AChE - Colinesterases acetilcolinesterase
AMPc - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ARE – Elemento de resposta antioxidante
ATP – Adenosina trifosfato
BChE - butirilcolinesterase
CAT - Catalase
CDCACR - Complexo enzimático desidrogenase de cadeia ramificada
ChAT - Colina acetiltransferase
CHT - Transportador de colina
CIC - Ácido α - cetoisocapróico
CIV - Ácido α -cetoisovalérico
CMV - Ácido α -ceto-beta-metilvalérico
CO₂ – Dióxido de carbono
CREB - Elemento responsivo ao alvo de proteínas
DCH – Diclorofluoresceína
DM – Diabetes mellitus
DXB - Doença da urina do xarope do bordo
E1 – α -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada
E2 – Dihidrolipoil transacilase
E3 – Dihidrolipoamida desidrogenase
EIM - Erros inatos do metabolismo
EOX – Estresse oxidativo
ERNs – Espécies reativas de nitrogênio
ERO - Espécie reativa de oxigênio
FAD - Flavina-adenina-dinucleotídeo
FADH₂ - Diidrogeno flavina adenina dinucleotídeo
GABA - Ácido gama aminobutírico

GSH-Px - Glutathione peroxidase
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HIC - Ácido α -hidroxi-isocapróico
HIV - Ácido α -hidroxi-isovalérico
HMV - Ácido 2-hidroxi- β -metilvalérico
Iso - Isoleucina
Leu – Leucina
LPS - Lipopolissacarídeo
MDA - Malondialdeído
NAC - N-acetilcisteína
NAD⁺ - Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NF- κ B - fator nuclear kappa beta
NK - Célula natural killer
NO - Óxido nítrico
Nrf2 - Fator nuclear 2
ONOO - Peroxinitrico
PNTN - Programa Nacional de Triagem Neonatal
RNS - Espécies reativas de nitrogênio
SNC - Sistema nervoso central
SOD - Superóxido dismutase
SPSS - Pacote estatístico para as ciências sociais (do inglês *Statistical Package for Social Science*)
SUS - Sistema Único de Saúde
TBA-RS - Ácido tiobarbitúrico
TGF-beta - Fator de transformação do crescimento beta
TLR-4 - Receptores tipo *Toll-like-4*
TNF alfa - Fator de necrose tumoral alfa
Th-1 - Linfócito T helper 1
Th-2 - Linfócito T helper 2
Val – Valina
VDR - Receptor de vitamina D

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 ERRO INATO DE METABOLISMO	11
1.2 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO.....	12
1.2.1 Histórico	13
1.2.2 Aminoácidos de cadeia ramificada: metabolismo e regulação	13
1.2.3 Epidemiologia	16
1.2.4 Manifestações clínicas	16
1.2.5 Diagnóstico	19
1.2.6 Tratamento	20
1.2.7 Fisiopatologia	22
1.3 RADICAIS LIVRES E DEFESAS ANTIOXIDANTES	23
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E DXB.....	24
1.5 ACHADOS NEUROLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS	25
1.6 SISTEMA COLINÉRGICO	25
1.7 VITAMINA D	26
1.8 JUSTIFICATIVA	29
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 METODOLOGIA	31
3.1 ANIMAIS	31
3.2 MODELO ANIMAL	31
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	31
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	33
3.4.1 Habituação ao campo aberto	33
3.4.2 Memória de reconhecimento de objetos	33
3.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	34
3.6 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO:	35
3.6.1 Dosagem do conteúdo de sulfidrilas	35
3.6.2 Medida da oxidação de 2',7'-Diclorofluoresceína (DCFH)	35
3.6.3 Medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	35

3.6.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)	36
3.6.5 Atividade da catalase (CAT).....	36
3.7 ENSAIO COMETA ALCALINO	37
3.8 AVALIAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO	37
3.8.1 Avaliação da atividade da AChE	37
3.8.2 Avaliação da atividade da ChAT	38
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4 RESULTADOS.....	39
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 ERRO INATO DE METABOLISMO

Proposto pela primeira vez, em 1908, por Archibald Garrod, o termo Erro Inato de Metabolismo (EIM), foi descrito por meio de estudos sobre desordens metabólicas realizados em pacientes com alcaptonúria, observando que indivíduos afetados apresentavam grandes quantidades de ácido homogentísico excretadas na urina (Garrod, 1923). Assim, são distúrbios hereditários, em que a principal característica bioquímica é a deficiência ou ausência de uma determinada atividade enzimática que leva a um bloqueio total ou parcial de uma rota metabólica na qual resulta em acúmulo de substrato e a falta do produto (Karam et al., 2013; Carakushansky, 2022).

Os pacientes com EIM podem apresentar manifestações clínicas diversas e sintomas graves de modo que, na grande maioria, o sistema nervoso central (SNC) é o mais afetado com ocorrência de retardo neuropsicomotor e neurodegeneração progressiva (Garrod, 1908; Garrod, 1923; Beudet et al., 2004; Saudubray J. M. e Garcia-Cazorla A., 2018). Assim, os EIM podem ser divididos em grupos de “Pequenas ou Grandes moléculas”, tendo a Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB) como exemplo de pequenas moléculas, que se caracteriza por manifestações precoces e que possam necessitar de cuidados emergenciais (Saudubray J. M. e Garcia-Cazorla À., 2018).

Outra forma de classificação dos EIM relaciona-se à repercussão celular e metabólica, onde quatro tipos de distúrbios estão presentes, sendo os mesmos: distúrbios de transporte, síntese, armazenamento e de metabolismo intermediário. O primeiro tipo de defeito, afeta o transporte renal e/ou intestinal de moléculas orgânicas ou inorgânicas, sendo em grande maioria manifestados através da dieta, levando à desnutrição. Por sua vez, nos distúrbios de síntese, a produção de moléculas ocorre de forma anormal ou incompleta. Já nos distúrbios de armazenamento, desencadeia o acúmulo de substratos que são depositados nas células em quantidades anormais, contribuindo para a alteração da forma e funcionamento. Por fim, os distúrbios do metabolismo intermediário apresentam uma deficiência enzimática das rotas de metabolização de pequenas moléculas, provocando o acúmulo do substrato da enzima deficiente e de seus metabólitos de modo que a deficiência do produto final da rota não seja suprido por outra via metabólica (Saudubray e Charpentier, 2019). Dessa forma, quando analisados, os números de casos individuais de EIM são considerados raros; todavia, quando observados em conjunto podem atingir um em cada mil nascidos vivos correspondendo a cerca

de 10% das doenças genéticas (Waters et al., 2018; Vieira et al., 2019). Já foram descritos aproximadamente 1000 distúrbios envolvendo defeitos na síntese, transporte, armazenamento e degradação de moléculas no organismo (Arnold, 2018).

O Brasil conta com um centro de referência nacional para o diagnóstico e tratamento de erros inatos do metabolismo e dos registros dos mesmos chamado Serviço de Informação Sobre Erros Inatos do Metabolismo (SIEM) localizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre criado em 2001 (Vieira et al., 2019). O serviço conta ainda com um serviço telefônico gratuito, que presta informações para médicos e profissionais da saúde envolvidos no diagnóstico e tratamento de pacientes com diagnóstico confirmado ou suspeita de EIM, por meio de uma equipe multidisciplinar. O tratamento necessário para essas doenças geralmente é financiado por pesquisas e é fornecido sem nenhum custo ao paciente (Vieira et al., 2019).

1.2 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO

Considerada um tipo de EIM, a Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB) é uma doença genética de herança autossômica recessiva ocasionada pela deficiência da uma subunidade do complexo enzimático desidrogenase de cadeia ramificada alfa mitocondrial (CDCCR) (Strauss e Morton, 2003; Chuang et al., 2019). Esta deficiência enzimática resulta no aumento de 5 a 10 dez vezes dos níveis séricos dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina, bem como, seus respectivos alfa-cetoácidos, resultante de mutações nas proteínas E1 α ou E1 β da enzima E1 ou da proteína da enzima E2 do CDCCR, sendo responsáveis pelo desencadeamento da doença (Sperringer et al., 2017; Chuang et al., 2019).

Quando não tratada, a DXB pode levar a anormalidades do desenvolvimento cerebral, retardo mental e mortes infantis precoces. Bebês que apresentam tal desordem genética, dentro de 48 horas após o parto, quando não tratados, apresentam cetonúria, alimentam-se mal e em aproximadamente 5 dias os sintomas neurológicos progridem para letargia, apnéia intermitente e podem apresentar odor de xarope do bordo, semelhante a açúcar queimado na urina (Strauss e Morton, 2003). Ademais, crianças que sobrevivem à DXB apresentam danos neurológicos variáveis, tais como, retardo mental e dificuldade na fala e problemas psicomotores (Chuang et al., 2019).

1.2.1 Histórico

O primeiro relato de DXB na literatura foi descrito por Menkes et al., em 1954 no Hospital Infantil de Boston, quando observaram uma doença degenerativa cerebral em quatro indivíduos de uma mesma família. A manifestação dos primeiros sintomas se dava na primeira semana de vida e apresentava desfecho fatal dentro de três meses. Os principais sintomas eram: edema cerebral, convulsões, espasticidade e dificuldade respiratória. Além disso, a urina apresentou um odor de xarope do bordo, semelhante a açúcar queimado ou caramelo, principal característica comum aos quatro pacientes no qual resultou no nome da doença (Menkes et al., 1954).

Por sua vez, Westall e colaboradores no ano de 1957 observaram altas concentrações dos AACR leucina, isoleucina e valina no plasma de outro paciente analisado (Westall et al., 1957). Mas apenas na década de 60, o pesquisador Joseph Dancis observou a principal causa bioquímica desta desordem genética, resultando na deficiência do complexo enzimático, responsável pela descarboxilação dos α -cetoácidos de cadeia ramificada. Assim, a causa do bloqueio enzimático na DXB ocorre pelo insuficiente suprimento de uma enzima que catalisa no processo de descarboxilação oxidativa, participando no processo de metabolismo desses aminoácidos (Dancis et al., 1960). Dessa forma, Snyderman et al., em 1964, sugeriu então o primeiro tratamento para a DXB, através de uma restrição alimentar dos AACR (Snyderman, 1967).

1.2.2 Aminoácidos de cadeia ramificada: metabolismo e regulação

Os AACR são provenientes da dieta correspondendo cerca de 40% dos aminoácidos essenciais e 35% indispensáveis para o tecido muscular em indivíduos normais (Frazier et al., 2014; Sperringer et al., 2017). Eles apresentam como principal destino a manutenção das proteínas corporais e síntese de neurotransmissores a partir do fornecimento de nitrogênio (Schadewaldt e Wendel, 1997). Além disso, os AACR são precursores da síntese de ácidos graxos e colesterol, bem como, substratos fundamentais para produção de energia através da via succinil-COA e acetoacetato (Chuang et al., 2019). Por sua vez, não podem ser sintetizados pelo organismo (Harris et al., 2005).

Desse modo, esses AACR possuem participação direta e indiretamente em uma variedade de tarefas bioquímicas fundamentais no cérebro, as quais englobam: síntese proteica, produção de ATP, produção de neurotransmissores como serotonina e as catecolaminas, bem

como na compartimentalização de glutamato (Harris et al., 2005). Logo, as enzimas responsáveis pela degradação desses aminoácidos são encontradas em diversos tecidos e geralmente requerem o deslocamento dos metabólitos para o catabolismo completo (Sperringer et al., 2017).

O catabolismo dos AACR é representado por três etapas para a sua oxidação: transaminação, descarboxilação e esterificação. Dessa maneira, o metabolismo inicia-se com o transporte destes aminoácidos para dentro das células por meio do sistema de transporte L, localizado na membrana plasmática celular (Barker e Ellory, 1990). No interior da célula, ocorre a transaminação reversível, a qual é catalisada pela aminotransferase de cadeia ramificada, apresentando duas isoformas: citosólica e mitocondrial. Dessa forma, ocorre a produção dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada, ácido alfa-cetoisocapróico (CIC), alfa-ceto-beta-metilvalérico (CMV) e ácido alfa-cetoisovalérico (CIV) a partir da leucina, isoleucina e valina, respectivamente. Em seguida, os alfa-cetoácidos de cadeia ramificada são transportados por um transportador específico para dentro da mitocôndria, local em que ocorre a etapa de descarboxilação oxidativa irreversível. Esta reação é responsável pela formação dos seus hidroxiácidos: ácido alfa-hidroxi-isocapróico (HIC), ácido alfa-hidroxi-isovalérico (HIV) e ácido alfa-hidroxi- β -metilvalérico (HMV) os quais serão metabolizados por vias específicas. Por fim, a terceira etapa é fundamental para a desidrogenação dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada, por meio da ação das desidrogenases acil-CoA específicas. Logo, os produtos deste catabolismo são acetil-CoA e acetoacetado decorrentes da leucina. A isoleucina é degradada até acetil-CoA e succinil-CoA, assim como succinil-CoA é produzido a partir da valina. Dessa forma, observa-se que estes compostos entram no ciclo de Krebs e podem ser tanto cetogênicos quanto glicogênicos (Burrage et al., 2014).

O complexo desidrogenase dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada é responsável pela formação de complexos de desidrogenases de alfa-cetoácidos presentes na membrana interna da mitocôndria das células e pela descarboxilação dos AACR leucina, valina e isoleucina (Yeaman, 1986; Reed e Hackert, 1990; Chuang et al., 2019). Além disso, o complexo é regulado por duas enzimas regulatórias, uma quinase e outra fosfatase, responsáveis pela fosforilação e desfosforilação do complexo, de modo que o defeito em um dos componentes será responsável pelo acúmulo de AACR em decorrência da deficiência do complexo desidrogenase dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada (Eisenstein et al., 1991; Chuang et al., 2019).

A regulação do fluxo de α -cetoácido que são empregados na geração de energia e a irreversibilidade da via catabólica são atribuídas à atividade do complexo enzimático

desidrogenase dos alfa-cetoácidos, demonstrados na figura 1. Este complexo, identificado como uma macromolécula, é composto por três componentes catalíticos: uma α -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada heterotetramérica ($\alpha 2\beta 2$), conhecida como E1 (12 cópias); uma dihidrolipoil transacilase (24 cópias), também designada como E2; e uma dihidrolipoamida desidrogenase homodimérica, referida como E3 (6 cópias) (Reed e Hackert, 1990; Sperringer et al., 2017). Os componentes E1 e E2 são específicos para o complexo dos α -cetoácidos desidrogenase de cadeia ramificada, enquanto a proteína E3 também integra os complexos α -cetoglutarato e piruvato desidrogenase (Reed e Hackert, 1990).

Dessa forma, o componente E1 desempenha a catalisação da descarboxilação dos α -cetoácidos, mediada pela tiamina pirofosfatase (Treacy et al., 1992; Peinemann e Danner, 1994; Chuang et al., 2019), reduzindo a molécula de lipoil que se conecta ao E2. A molécula de lipoil reduzida e seu domínio são então utilizados para transferir o grupo acil do E1 para a Coenzima A, aumentando, assim, a quantidade de acil-CoA. Por sua vez, o componente E3, fortemente ligado ao Dinucleotídeo de Adenina Flavina (FAD), realiza a reoxidação do resíduo di-hidrolipoil do E2 com o Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD^+), atuando como último receptor de elétrons (Reed e Hackert, 1990; Chuang et al., 2019). Esse processo culmina na produção de acil-CoA de cadeia ramificada, dióxido de carbono (CO_2) e NADH (Danner et al., 1979).

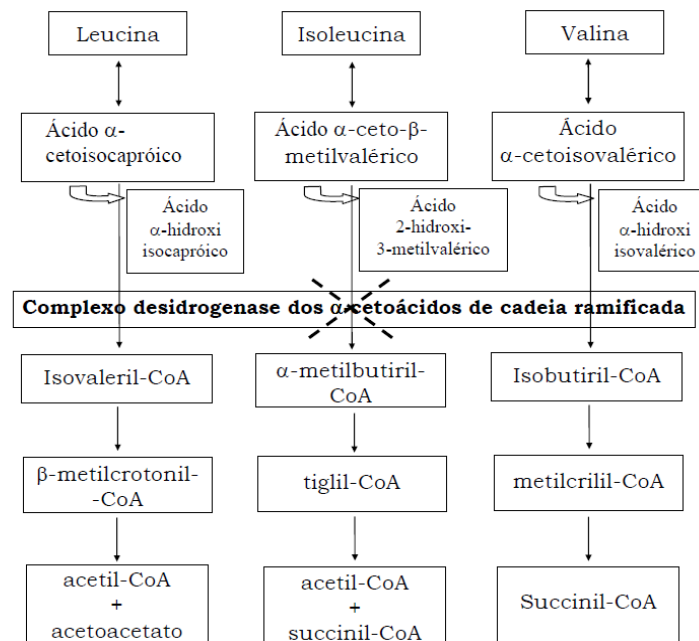


Figura 1 - **Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada**. leucina, isoleucina e valina, mostrando a etapa em que a enzima é deficiente nos pacientes com DXB. Adaptado de Scriver et al., 2001.

O complexo CDCCR humano é codificado por seis lócus genéticos: E1 α , E1 β , E2, E3, CDCCR quinase e CDCCR fosfatase. Com base na subunidade afetada do CDCCR, a DXB é diferenciada em quatro grupos moleculares, que demonstram a heterogeneidade genética (Chuang et al., 2006; Chuang et al., 2019). Entre os tipos, destaca-se: tipo I α para as mutações no gene BCKDHA (subunidade E1 α); tipo I β para as mutações encontradas no gene BCKDHB (subunidade E1 β), tipo II para mutações no gene DBT (subunidade E2) e tipo III para mutações no gene DLD (subunidade E3) (Fisher et al., 1991; Nellis e Danner, 2001; Quental et al., 2008). Atualmente, já foram relatadas 259 mutações causadoras da DXB (Imtiaz et al., 2017).

1.2.3 Epidemiologia

A DXB é considerada uma doença genética rara, com incidência estimada de 1:185.000 nascidos vivos (Frazier et al., 2014; Chuang et al., 2019). Em americanos caucasianos e na França, a incidência é de 1:290.000 nascimentos. Certas populações como Menonitas da Pensilvânia, Kentucky, Nova York, Indiana, Wisconsin, Michigan, Iowa e Missouri tem carregado uma maior frequência para a forma clássica da DXB, chegando à incidência de aproximadamente 1:380 nascidos vivos (Puffenberger, 2003; Chuang et al., 2019). Além disso, outros trabalhos trazem uma incidência ainda mais alta relatada na Menonita de até 1:176 nascimentos, com ancestrais Franco-canadenses e nos descendentes de judeus Ashkenazi (Puffenberger, 2003).

1.2.4 Manifestações clínicas

Indivíduos afetados com DXB apresentam manifestações clínicas variadas as quais dependem da atividade enzimática e do tipo de mutação presente que caracterizam diferentes fenótipos clínicos classificados em forma clássica e variantes, dividindo-se em intermediária, intermitente, responsiva à tiamina e deficiência de lipoamida desidrogenase E3 (Tabela 1). Para classificar o distúrbio metabólico considera-se a idade de início dos sintomas bem como a gravidade da doença (Serra et al., 2010; Chuang et al., 2019). Os fenótipos clínicos bem como suas características predominantes encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos fenótipos da Doença da Urina do Xarope do Bordo levando em consideração as manifestações clínicas

Fenótipo clínico	Características clínicas
Clássica	Início neonatal, recusa alimentar, hipoglicemia, letargia, cetoacidose, desordens neurológicas, convulsões, coma.
Intermediária	Crescimento alterado, desenvolvimento psicomotor e físico prejudicados, frequência diminuída de cetoacidose.
Intermitente	Ataxia, cetoacidose por infecções ou estresse, geralmente sem danos intelectuais.
Responsiva à tiamina	Semelhante à forma intermediária.
Deficiência de E3	Desenvolvimento neuropsicomotor prejudicado, deterioração progressiva, hipotonia, acidose láctea.

Fonte: Adaptado de Chuang e Shih, 2001.

O fenótipo clássico consiste no mais comum e grave da doença, representando cerca de 80% dos casos de DXB. Sucção débil, letargia, perda de peso, recusa alimentar, alterações neurológicas progressivas além do odor característico da doença presente na urina ou no cerúmen podem ser observadas em alguns pacientes. As primeiras manifestações clínicas geralmente se iniciam entre o quarto e sétimo dia de vida do recém-nascido. Quando não tratados os sintomas apresentados pelos pacientes podem evoluir para edema cerebral, convulsões, coma e óbito (Chuang et al., 2006; Carakushansky, 2022). Nesta fase, o número de AACR e de alfa-cetoácidos de cadeia ramificada com destaque aos níveis de leucina e CIC estão alterados seriamente. Tais níveis aumentados de leucina estão relacionados diretamente com a intensidade do odor na urina, sendo esse mais evidente em episódios de descompensação metabólica (Chuang et al., 2019).

A forma intermediária, por sua vez, não apresenta sintomas no período neonatal e tem seu diagnóstico por volta dos cinco meses a sete anos de vida. Embora os pacientes não apresentem quadros de descompensação metabólicas presentes na forma clássica, eles possuem níveis elevados dos aminoácidos podendo apresentar distúrbios alimentares e de crescimento, atraso do desenvolvimento durante a infância ou quadro de retardo mental progressivo e

inespecífico. A atividade normal do complexo desidrogenase dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada encontra-se entre 0% a 30% (Chuang et al., 2019).

Pacientes com a forma intermitente da doença são diagnosticados de forma mais tardia, podendo sofrer descompensação metabólica em situações de estresse, quadro infeccioso ou sobrecarga de proteínas provenientes da alimentação. A atividade normal do CDCCR situa-se de 5% a 25% (Wendel e Ogier De Baulny, 2006; Chuang et al., 2019). Neste fenótipo, os pacientes apresentam sintomas entre cinco meses a dois anos de idade e a ingestão de leucina proveniente de uma dieta normal é tolerada. Os níveis dos AACR e de seus respectivos ácidos orgânicos podem ser normais ou então apresentarem elevações significativas. Contudo, em períodos de estresse fisiológico as características clínicas e bioquímicas da forma clássica são apresentadas (Strauss et al., 2010).

Os pacientes na forma responsiva à tiamina não apresentam doença neonatal aguda e possuem um melhor quadro clínico, de modo que a atividade enzimática fica entre 2% e 40%. As manifestações clínicas mais comuns nesta fase são descompensação metabólica, desenvolvimento físico normal e acidose. Embora os níveis séricos de AACR sejam cinco vezes maiores que os níveis normais, quando suplementados com doses entre 10 e 1000 mg/dia com tiamina e dieta com restrição proteica, os pacientes apresentam redução para níveis normais (Chuang et al., 2004).

A forma originada pela deficiência da subunidade E3 é a mais rara, com apenas vinte casos descritos na literatura. Semelhante à forma intermediária os pacientes apresentam sintomas manifestados tanto no período neonatal como de forma mais tardia, de forma que a acidose láctica é a manifestação clínica mais grave (Chuang et al., 2019). Neste tipo de manifestação há a deficiência de três enzimas desidrogenases no componente E3, são elas: piruvato desidrogenase, desidrogenase do α -cetoglutarato desidrogenase e o CDCCR. Além disso, é caracterizada por elevações plasmáticas de lactato, piruvato e alanina (Strauss et al., 1993; Chuang et al., 2019).

A atividade enzimática residual não é o único fator que influencia na expressividade da doença, outros fatores como ingestão de calorias, quantidade e qualidade proteicas, frequência e gravidade das infecções, episódios de estresse fisiológico e fase de crescimento em que o paciente se encontra nos quadros de descompensação metabólica também podem influenciar (Strauss et al., 2010; Chuang et al., 2019).

1.2.5 Diagnóstico

A principal forma de diagnosticar a DXB é fundamentalmente laboratorial, onde são dosadas as concentrações urinárias e plasmáticas dos AACR leucina, isoleucina e valina com seus respectivos alfa-cetoácidos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-MS) (Wajner et al., 2001; Chuang et al., 2019) com maior ênfase na leucina e aloisoleucina, sendo este o mais sensível e específico marcador da doença (Schadewaldt et al., 1999; Piri-Moghadam et al., 2022). Além disso, os exames laboratoriais são realizados nas seguintes situações: paciente com teste de triagem positivo para DXB, pacientes com manifestações clínicas sugestivas de DXB ou que apresentam casos familiares para DXB (Chuang et al., 2019).

Dessa forma, são realizados para a avaliação da DXB testes de triagem em recém-nascidos. Os programas populacionais variam de acordo com cada país em que questões éticas, científicas, sociais e dados clínicos guiam a decisão. A literatura mostra que programas de triagem expandida baseada na população de recém-nascidos têm melhorado significativamente os resultados da saúde para algumas pessoas com DXB, embora ainda existam pacientes que não se beneficiam da detecção precoce (Van Rijt et al., 2016). É necessário realizar os testes nas primeiras 48 horas de vida, sendo que recém-nascidos criticamente doentes em 24 a 48 horas de vida deverão seguir imediatamente ao tratamento (Harris-Haman et al., 2017).

Considerado um programa de grande importância nacional no Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) foi criado em 6 de junho de 2001 com intuito de rastreamento populacional, tendo como principal objetivo identificar doenças e distúrbios no recém-nascido, em tempo oportuno, para intervenção adequada e garantir tanto tratamento quanto acompanhamento contínuo aos pacientes com diagnóstico positivo, a fim de melhorar a qualidade de vida e reduzir a morbimortalidade. Essa triagem neonatal é realizada a partir de uma matriz biológica chamada “teste do pezinho”, responsável por identificar precocemente indivíduos com doenças endócrinas, genéticas, metabólicas e enzimáticas, para que estes possam ser tratados em tempo adequado, evitando assim as sequelas e até mesmo a morte (Ministério Da Saúde, 2002; Amâncio et al., 2007; Mallmann et al., 2020). O PNTN ofertado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) tem em seu escopo seis doenças: Fenilcetonúria, Hipotireoidismo Congênito, Doença Falciforme e outras hemoglobinopatias, Fibrose Cística, Hiperplasia Adrenal Congênita e Deficiência de Biotinidase (Ministério Da Saúde, 2002). Dessa forma, a DXB não estava inserida no escopo do “teste do pezinho” no Brasil de modo que apenas os casos suspeitos eram submetidos ao “teste do pezinho ampliado”, fornecido

apenas por laboratórios privados (Herber et al., 2015). Assim, em 2021 foi sancionada a Lei 14.154/2021 que garante a ampliação do teste do pezinho, para até 53 doenças, sendo implementada em 5 etapas, dessa forma, a DXB entra na segunda etapa de implementação por ser uma aminoacidopatia (Brasil, 2021).

Sabe-se que a DXB é causada por mutações patogênicas presentes em 4 genes que codificam as três subunidades do complexo mitocondrial DCACR. De acordo com os dados da *Human Gene Mutation Database*, atualmente existem 259 mutações relacionadas à doença (Imtiaz, 2017). Sendo assim, pessoas identificadas com DXB necessitam ser testados para as mutações genéticas envolvidas, através de testes genéticos moleculares, que incluem análises de sequência, variantes patogênicas e análises de deleção/duplicação (Strauss, Puffenberger, Morton, 2006).

Além disso, as atividades enzimáticas também podem ser medidas por meio de exames complementares incluindo atividade enzimática do complexo desidrogenase dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada em linfócitos, fibroblastos da pele, bem como biópsia hepática, auxiliando no diagnóstico da doença (Strauss et al., 2006). É fundamental que o diagnóstico desta patologia seja feito precocemente, em virtude de os danos neurológicos estarem relacionados ao tempo e ao período de exposição aos metabólitos tóxicos (Chace et al., 1995).

1.2.6 Tratamento

O manejo médico para a DXB tem como objetivo principal restabelecer a homeostasia do metabolismo e evitar assim descompensações metabólicas por meio de um estado não catabólico. Vale ressaltar que a terapia deve iniciar em conjunto aos estudos diagnósticos que confirmem a enfermidade e não esperar pelos resultados formais (Frazier et al., 2014; Strauss et al., 2020). Logo, a principal forma de tratamento para a DXB é por meio de uma dieta restrita em proteínas, principalmente do aminoácido leucina, a fim de diminuir as concentrações de AACR e normalizar a toxicidade dos metabólitos acumulados de maneira que não haja prejuízo no desenvolvimento e crescimento dos pacientes. A terapia nutricional deve ser iniciada o mais cedo possível, ainda nas primeiras semanas de vida e realizada conforme a fase da doença, baseando-se nos valores séricos dos aminoácidos do paciente (Blackburn et al., 2017; Deon et al., 2023).

Na fase aguda e mais grave da doença, o tratamento é mais agressivo e pode ocorrer de forma exógena por meio de hemofiltração e diálise ou através de dieta específica para via endógena em virtude do aumento das concentrações dos AACR e de sua cetoácidos (Atwal et

al., 2015; Blackburn et al., 2017). A ocorrência de descompensação metabólica nesta fase é alta, assim como episódios de febre, jejum prolongado ou estresse fisiológico decorrente de infecções em virtude da alta ingestão proteica, foi desenvolvido para estes pacientes, uma terapia realizada com nutrição enteral composta por AACR restritos em leucina, isoleucina e valina combinados com glicose, lipídeos e vitaminas a fim de melhorar quadros de descompensação e nutrir de forma balanceada o paciente. Além disso, altas concentrações de glicose são ministradas a fim de aumentar a secreção de insulina e contribuir para a redução dos níveis de leucina e suprimir o catabolismo proteico (Frazier et al., 2014; Herber et al., 2015; Blackburn et al., 2017; Strauss et al., 2020).

Por sua vez, na fase de manutenção, é ofertado ao paciente uma fórmula específica para a doença isenta de AACR, constituída por outros aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais e oligoelementos a fim de prevenir danos neurológicos e morte (De Lonlay et al., 2021). A terapia nutricional iniciada no período neonatal é capaz de prevenir a evolução da doença e suas respectivas consequências e até mesmo reverter um quadro clínico (Amâncio et al., 2007; Frazier et al., 2014).

O plano alimentar deve ser calculado de forma individual e a partir dos níveis séricos de AACR apresentado pelo paciente baseado na necessidade calórica diária (Blackburn et al., 2017). Desse modo, os valores das concentrações séricas devem variar para a leucina entre 100-300 $\mu\text{mol/L}$, isoleucina de 200-400 $\mu\text{mol/L}$ e valina 200-400 $\mu\text{mol/L}$, sendo que níveis plasmáticos considerados dentro da normalidade desses AACR, após 2 a 3 horas da ingestão de proteínas, são: 80-200 $\mu\text{mol/L}$ (1,0-2,6 mg/dl) para leucina, isoleucina entre 40-90 $\mu\text{mol/L}$ (0,5-1,2 mg/dl) e 200-425 $\mu\text{mol/L}$ (2,3-5,0 mg/dl) para a valina (Wendel e Ogier De Baulny, 2006).

No entanto, o excesso de restrição dietética pode ocasionar um atraso no crescimento e desenvolvimento global, anemia, imunodeficiência, desmielinização e lesões de pele (Morton et al., 2002). Ademais, mesmo com uma dieta cuidadosamente monitorada, doenças secundárias podem levar a crise metabólica e danos neurológicos. Dessa forma, um tratamento alternativo para a DXB é o transplante hepático eletivo (Deon et al., 2023).

Nos casos mais graves da patologia, o transplante hepático pode ser uma estratégia utilizada como forma de tratamento com intuito de restaurar parte das funções enzimáticas destes pacientes de forma que possibilita ao paciente uma dieta livre (Strauss et al., 2020; Deon et al., 2023). Isso ocorre pelo aumento em cerca de 10% a atividade do CDCCR sobre o organismo, quantidade esta suficiente para manter o equilíbrio dos aminoácidos e aumentar a tolerância do paciente na ingestão de proteínas. Algumas limitações são encontradas neste tipo

de tratamento para a DXB como: quantidade do órgão insuficiente para transplante, riscos cirúrgicos e uso de imunossupressores ao longo da vida (Deon et al., 2023).

Além disso, estratégias farmacológicas estão sendo estudadas para possíveis formas de tratamento da DXB, sendo elas fenilbutirato de sódio e carnitina, que já apresentam resultados na clínica, melhorando os níveis de AACR e parâmetros de dano, respectivamente (Brunetti-Pierri et al., 2011; Mescka et al., 2013; Mescka et al., 2015). Contudo, os estudos e seus resultados são limitados para indicar terapias adjuvantes e se essas irão alterar as recomendações dietéticas. Esperam-se novas diretrizes para o tratamento em busca de melhorar o prognóstico desses pacientes (Strauss et al., 2020; Deon et al., 2023).

1.2.7 Fisiopatologia

Embora os mecanismos tóxicos dos AACR não estejam bem claros, alguns estudos mostram que, quando administrados, os AACR principalmente a leucina e seu alfa-cetoácido CIC provocam sintomas neurológicos como encefalopatia aguda e edema cerebral grave, enquanto a isoleucina relacionou-se com o aumento do odor de xarope do bordo na urina e a valina não apresentou efeitos significativos (Chuang et al., 2019). Além disso, a toxicidade destes metabólitos pode reduzir a produção do principal neurotransmissor inibitório do SNC, o ácido gama aminobutírico (GABA), de forma que ocorre uma perda significativa de receptores pós-sinápticos em um modelo de DXB (Dodd et al., 1992). Dessa forma, a elevação de leucina e CIC no espaço extracelular pode alterar a concentração no SNC de aminoácidos como triptofano, valina, metionina, tirosina, isoleucina, fenilalanina e glutamina transportados pelo sistema L (Smith et al., 1987; Araújo et al., 2001). Como consequência, pode acontecer alteração da biossíntese de alguns neurotransmissores como a serotonina e catecolaminas (Yuwiler e Geller, 1965; Gibson e Blass, 1976; Huang et al., 1996; Zielke et al., 1996; Araújo et al., 2001; Amaral e Wajner, 2022).

Além disso, por ter absorção através da barreira hematoencefálica de forma mais rápida quando comparada a outros aminoácidos, a leucina possui função essencial no suprimento do glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC, pelo ciclo leucina-glutamato de modo que o excesso de CIC leva à redução em média de 50% de glutamato intracelular (Dodd et al., 1992; Yudkoff et al., 2005; Zinnanti et al., 2009). Desse modo, estudos apontam que os alfa-cetoácidos de cadeia ramificada podem inibir a captação nas fendas sinápticas de glutamato de forma similar a pacientes em descompensação metabólica (Reis et al., 2000; Tavares et al., 2000; Amaral e Wajner, 2022).

1.3 RADICAIS LIVRES E DEFESAS ANTIOXIDANTES

Os radicais livres caracterizam-se por estruturas químicas que apresentam um elétron desemparelhado, ou seja, aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular isoladamente, o que os torna muito instáveis e com grande capacidade de combinar-se de maneira inespecífica com diversas moléculas integrantes da estrutura celular (Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2015). Dessa forma, os radicais livres são formados tanto de forma endógena como subprodutos do metabolismo aeróbico, quanto por fatores externos como dieta inadequada, abuso álcool e tabagismo, uso de quimioterápicos e demais drogas, poluição atmosférica dentre outros (Ames et al., 1993; Halliwell, 1994; Dröge, 2002).

Já o termo espécies reativas de oxigênio (ERO), está relacionado não só aos radicais formados pela redução do oxigênio (superóxido- O_2^-) e hidroxila (OH), mas também a alguns não radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2). Além disso, existem também as espécies reativas de nitrogênio (RNS) que são representadas pelo óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO) (Halliwell e Gutteridge, 2015). Tanto as ERO quanto as RNS, em baixas quantidades são fundamentais em muitos processos bioquímicos tais como a comunicação intracelular, apoptose, defesa contra agentes infecciosos dentre outros. Contudo, quando produzidos em excesso ou quando ocorre uma deficiência na sua remoção, pode ocasionar um estado pró-oxidante que corrobora para ocorrência de lesões oxidativas em estruturas celulares como lipídios, proteínas e DNA. Desse modo, os radicais livres podem contribuir para a lipoperoxidação, promover a oxidação proteica levando a sua inativação e podem também reagir com DNA e RNA provocando mutações ou distúrbios de transcrição (Halliwell, 1996; Delanty e Dichter, 1998; Halliwell e Gutteridge, 2015).

Por sua vez, as defesas antioxidantes são substâncias exógenas ou endógenas que possuem função de reduzir a formação de radicais livres ou inativar os mesmos. A fim de evitar o dano celular causado pela presença desses radicais, o organismo é responsável por possuir defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (Bonney et al., 2002). As primeiras podem ser exemplificadas por sistemas enzimáticos como superóxido dismutase (SOD), responsável por catalisar a dismutação do ânion superóxido a H_2O_2 ; pela enzima catalase (CAT) que realiza a decomposição direta do H_2O_2 formando água e oxigênio, e pela enzima glutathione peroxidase (GPx) responsável por catalisar a decomposição de peróxidos por meio da oxidação da glutathione reduzida (GSH) formando a glutathione oxidada (GSSG) (Halliwell, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2015). Já as defesas antioxidantes não enzimáticas incluem a melatonina, a coenzima Q, a glutathione e os estrógenos, que atuam de diferentes maneiras

combatendo diretamente os radicais livres, tornando-os menos reativos ou levando à produção de outros antioxidantes. Além disso, alguns antioxidantes podem ser obtidos por meio da alimentação tais como as vitaminas A, C e E assim como os polifenóis (Bonney et al., 2002; Salvador e Henriques, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2015).

Sendo assim, sabe-se que nos organismos saudáveis existe um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes, de forma que as defesas controlam as quantidades de espécies reativas deixando-as exercer seu papel dentro do metabolismo. Entretanto, quadros patológicos podem causar a quebra desse equilíbrio, seja pelo aumento de radicais livres ou pela diminuição de antioxidantes ou até mesmo pela combinação de ambos, o que resulta no que se conhece por estresse oxidativo (EOX) (Halliwell, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2015).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E DXB

A expressão EOX relaciona-se ao desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e as espécies reativas formadas (pró-oxidante) o que pode favorecer em dano oxidativo a componentes celulares (Halliwell e Gutteridge, 2015). Dependendo do tipo celular e da severidade do EOX, pode-se citar como principais consequências: oxidação de proteínas, lesões ao DNA e RNA, morte celular e lipoperoxidação da membrana (Halliwell e Chirico, 1993; Halliwell e Gutteridge, 2015).

Estudos mostram que embora todos os tecidos humanos sejam suscetíveis ao dano oxidativo, o cérebro parece ser especialmente sensível a este dano. Uma explicação para isso seria em decorrência do alto consumo de oxigênio utilizado pelo tecido cerebral, além de que as membranas neuronais possuem alta quantidade de lipídios poliinsaturados que são muito suscetíveis a lipoperoxidação. Por sua vez, a auto oxidação de neurotransmissores, como a noradrenalina e dopamina, produz espécies reativas, a qual pode ser acelerada pela presença de ferro que é amplamente distribuído no cérebro. Além disso, sabe-se que o tecido cerebral apresenta também um baixo nível de defesas antioxidantes (Halliwell e Chirico, 1993; Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2015).

Recentemente, tem-se demonstrado a relação do EOX atuando em vários EIM pela produção excessiva de radicais livres e pela redução de antioxidantes (Wajner et al., 2004; Sitta et al., 2014; Amaral e Wajner, 2022). No caso da DXB, estudos em animais demonstraram que os AACR (leucina, isoleucina e valina) bem como seus alfa-cetoácidos estimulam a lipoperoxidação em homogeneizado de cérebro de ratos (Bridi et al., 2005). Além disso, a

literatura aponta que a leucina e o ácido alfa-cetoisocapróico reduzem a capacidade do cérebro em modular o dano associado ao aumento de espécies reativas e que antioxidantes como a vitamina C e E, SOD e glutatona reduzida podem atenuar a lipoperoxidação aumentada pela leucina (Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005; Barschak et al., 2008). Ademais, algumas estratégias terapêuticas tem se mostrado eficientes na melhora de EOX em modelos animais, como uso de melatonina (Wessler et al., 2020; Duarte et al., 2023), memantina (Lemos et al., 2023), nanopartículas com fenilbutirato (Mescka et al., 2021), além da L-carnitina que já é utilizada na prática clínica (Mescka et al., 2013; Mescka et al., 2015; Mescka et al., 2016).

1.5 ACHADOS NEUROLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS

É sabido que mecanismos de neurotoxicidade são responsáveis por sequelas neurológicas observadas em pacientes acometidos com DXB. Esses mecanismos podem ser caracterizados por: privação de energia, desregulação osmótica, alterações nas concentrações do glutamato, GABA e aspartato no cérebro (Amaral e Wajner, 2022). Além da redução da absorção de aminoácidos essenciais no tecido cerebral (Wajner et al., 2000), apoptose de células neurais (Vilela et al., 2017) e EOX (Barschak et al., 2008; Sitta et al., 2014). Também, aumento da atividade da acetilcolinesterase (Scaini, De Rochi, et al., 2012) no cérebro, além de alterações dos níveis de neurotrofina (Scaini et al., 2017) e da neurotransmissão excitatória/inibitória através do SNC (Araújo et al., 2001; Amaral e Wajner, 2022).

Observa-se também através de estudos que os elevados níveis de AACR e seus respectivos α -cetoácidos estão relacionados ao aparecimento de alterações comportamentais observadas em pacientes afetados pela DXB (Muelly et al., 2013; Walterfang et al., 2013). As deficiências na aprendizagem, memória e comportamento resultam, pelo menos em parte, de modificações na função do sistema colinérgico (Scaini, De Rochi, et al., 2012; Scaini et al., 2014). Além disso, indivíduos com DXB apresentam elevados riscos de enfrentar problemas como depressão e ansiedade (Muelly et al., 2013).

1.6 SISTEMA COLINÉRGICO

O sistema colinérgico desempenha um papel crucial em diversas funções do organismo, influenciando a aprendizagem, memória e organização cortical do movimento (Mesulam et al., 2002). Este sistema é composto por neurônios responsáveis pela produção e liberação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Alloway, 2001).

A ACh está amplamente distribuída no SNC e desempenha funções essenciais em processos de transmissão sináptica, neuromodulação e plasticidade neuronal (Zhang et al., 2016). Além disso, está envolvida nos circuitos neurais que controlam o sono, aprendizado e memória, exercendo sua influência também no sistema nervoso periférico (Rauca et al., 1980; Picciotto et al., 2012).

Sendo assim, a síntese da ACh ocorre no citosol dos neurônios, derivando da acetil coenzima-A (acetil-CoA) e colina. Enquanto a acetil-CoA é produzida na mitocôndria, a colina é obtida da fenda sináptica, atravessando a membrana do terminal axônico por meio de um transporte ativo específico. A colina acetiltransferase (ChAT) catalisa essa combinação. Após a síntese, a ACh é armazenada em vesículas sinápticas até que ocorra um estímulo para sua liberação (Prado et al., 2002; Araújo et al., 2016). Sob estímulo, a despolarização da membrana pré-sináptica ocorre, aumentando a condutância do cálcio e facilitando a entrada da ACh no axônio (Prado et al., 2002; Prado et al., 2017). A liberação da ACh na fenda sináptica permite sua difusão no espaço extracelular ou sua degradação a colina e ácido acético pelas acetilcolinesterases (AChE) e butirilcolinesterases (BChE). Isso possibilita que o neurônio colinérgico retorne ao estado de repouso após a ativação (Araújo et al., 2016; Goulart et al., 2020).

É importante ressaltar que uma parte significativa da colina resultante é captada pelo terminal do axônio colinérgico por meio de um transportador de colina (CHT), sendo reutilizada na síntese de nova ACh (Mesulam et al., 2002). Além disso, na DXB é descrito alteração nos níveis de ACh pela diminuição da ChAT e aumento da AChE, estando associados ao aparecimento de danos a memória, dessa forma, sendo estudadas estratégias a fim de melhorar essas alterações (Scaini, De Rochi, et al., 2012; Wessler et al., 2019; Lemos et al., 2023). Dessa forma, visto a relação entre a alteração nos níveis de ACh, aumento estresse oxidativo e inflamação na DXB, estudos vem buscando entender a relação de algumas moléculas de importância terapêutica, sendo a vitamina D uma das moléculas de interesse, visto seu papel na melhora dos parâmetros anteriormente citados (Rodrigues et al., 2019; Sepidarkish et al., 2019; Rastegar-Moghaddam et al., 2022).

1.7 VITAMINA D

A vitamina D faz parte de um grupo de pró-hormônios lipossolúveis que podem ser obtidos pelo corpo por meio da pele através da exposição à luz solar bem como pela absorção intestinal de fontes alimentares e suplementos (Bikle, 2014). Dessa forma, esta vitamina possui

duas formas: a vitamina D2 ou ergocalciferol, de origem vegetal sendo produzida por plantas como cogumelos expostos a raios UV e vitamina D3 ou colecalciferol, que pode ser sintetizado na pele através da radiação ultravioleta – fonte principal – ou ingerido através da dieta por meio de peixes com alto teor de gordura, gema de ovo e óleo de peixe – fonte secundária (Feldman et al., 2018). Quando originária da dieta, a vitamina D é absorvida no intestino delgado, sendo assimilada pelos quilomícrons. Posteriormente, ela é transportada para o fígado. A partir desse ponto, o metabolismo é análogo ao da vitamina D sintetizada na pele (Premaor e Furlanetto, 2006).

As duas formas são biologicamente inertes e são convertidas para a sua forma ativa através de duas reações de hidroxilação enzimática: a primeira etapa ocorre no fígado, formando a 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], pela enzima 25-hidroxilase, enquanto a segunda etapa ocorre no rim, mediada pela 1 α -hidroxilase, produzindo a 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH) $_2$ D] ou calcitriol, a forma biologicamente ativa da vitamina D como demonstrado na figura 2 (Garcion et al., 2002; Bikle, 2014).

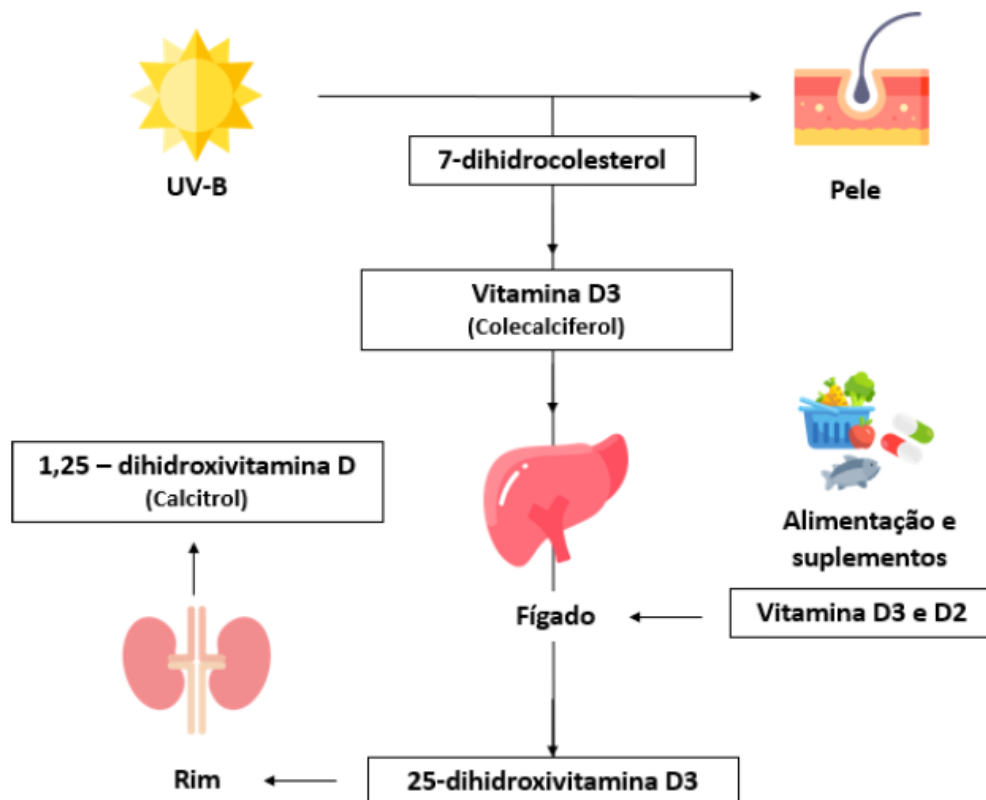


Figura 2 - Síntese e metabolismo da vitamina D (Adaptado de Conrado, Miranda-Filho e Bandeira, 2010).

Uma das principais atribuições da 1,25(OH) $_2$ D é assegurar níveis apropriados de cálcio e fósforo, tanto no sangue quanto extracelular, para sustentar diversas funções

metabólicas como absorção de cálcio, fosfato, bem como atuando na função imune e na prevenção de câncer (Chesney, 2012). Para alcançar esse objetivo, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ envolve a coordenação de vários órgãos, incluindo as suprarrenais, intestinos, rins e paratireoides (Premaor e Furlanetto, 2006). Sua responsabilidade engloba a facilitação da absorção intestinal de cálcio e fósforo, a mobilização do cálcio a partir do osso em colaboração com o hormônio da paratireoide, e o aumento da retenção renal de cálcio, desempenhando assim um papel crucial na regulação do metabolismo ósseo (Hosseini-Nezhad e Holick, 2013).

Além disso, por ser considerada um hormônio esteroide a vitamina D possui capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica (Dursun et al., 2011; Landel et al., 2016). Dessa forma, a vitamina D exerce funções biológicas em outros locais, como o SNC (Dursun et al., 2011; Annweiler, 2016). Existem receptores de vitamina D (VDR) em neurônios e nas células da glia (Annweiler, 2016), especialmente nas regiões ligadas à cognição, como hipocampo, hipotálamo e córtex (Annweiler et al., 2015). A vitamina D é capaz de regular a expressão de proteínas estruturais, fatores neurotróficos e neurotransmissores deficientes em doenças neurodegenerativas, como acetilcolina, dopamina, serotonina e GABA (Mpandzou et al., 2016). Também está relacionada com diminuição da inflamação relacionada à senescência natural, ao controle da homeostase de cálcio intraneuronal, além de apresentar características neuroprotetoras antioxidantes (Annweiler, 2016).

Evidências sugerem ainda que a hipovitaminose D pode estar correlacionada ao surgimento da depressão e de outras desordens como autismo e transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH). Assim, a deficiência desta vitamina pode aumentar as taxas do transtorno depressivo de 8 a 14%, ao passo que níveis adequados diminuem as chances do desenvolvimento dessa patologia (Libuda et al., 2019; Porto et al., 2019). Devido à variedade de locais nos quais seus receptores podem ser identificados, a insuficiência dessa substância também está ligada a condições autoimunes, como diabetes melito tipo 1, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide (Marques et al., 2010; Mitri et al., 2011). Além disso, há uma associação recente com diversos tipos de câncer e até mesmo com hipertensão arterial sistêmica. Para alguns estudiosos, ela é considerada um fator de risco abrangente (Peters et al., 2009).

Desse modo, sabe-se que a vitamina D pode contribuir no controle e produção de serotonina, neurotransmissor esse diminuído em pacientes depressivos. Assim, estudos demonstram que níveis diminuídos dessa vitamina estão associados há diminuição da produção da serotonina (Berridge, 2017; Barbosa, 2020). Além disso, a literatura aponta a existência da

relação direta entre a deficiência de vitamina D e o surgimento de depressão em qualquer faixa etária (Libuda et al., 2019; Porto et al., 2019).

1.8 JUSTIFICATIVA

Estudos demonstram que, tanto em pacientes quanto em modelos animais, a DXB, culmina com danos neurológicos graves, principalmente na aprendizagem e cognição no cérebro. Esses danos, que acometem tais pacientes, ocorrem por competição e/ou acúmulo cerebral de AACR, diminuição do metabolismo energético, EOX e alterações comportamentais. Além disso, evidências sugerem ainda que a restrição dietética leva à redução nas defesas antioxidantes, alterando parâmetros de EOX. A vitamina D por sua vez exerce funções biológicas em locais como o SNC, regulando fatores neurotróficos e neurotransmissores e apresentando características antioxidantes. Visto isso, o presente estudo buscou avaliar o efeito neuroprotetor da vitamina D sobre o comportamento, avaliação do sistema colinérgico e EOX em ratos submetidos a um modelo de DXB. Com resultados obtidos neste projeto, pretende-se auxiliar no manejo das terapias de pacientes com a doença, visto que os pacientes acometidos possuem danos neurológicos graves, sendo a suplementação vitamínica uma tentativa de melhorar a qualidade de vida e diminuir os danos ocasionados pela doença, além de melhor compreender a fisiopatologia da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito neuroprotetor da vitamina D sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em um modelo animal da DXB.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da vitamina D na habituação ao campo aberto em ratos *Wistar* submetidos a um modelo da DXB.

- Estudar os efeitos da vitamina D na memória de reconhecimento de objetos em ratos *Wistar* submetidos a um modelo da DXB.

- Avaliar a atividade do sistema colinérgico por meio da atividade das enzimas AChE e ChAT em ratos *Wistar* submetidos a um modelo da DXB.

- Analisar os efeitos da vitamina D sobre parâmetros de EOX por meio das análises do conteúdo de sulfidrilas, oxidação de DCFH, níveis de TBARS e dano ao DNA em ratos *Wistar* submetidos a um modelo da DXB.

- Avaliar os efeitos da vitamina D sobre a atividade enzimática da SOD e CAT em ratos *Wistar* submetidos a um modelo da DXB.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 64 ratos *Wistar* machos de 7 dias de vida. Os animais foram acondicionados com as mães até o desmame no 21º dia. Após isso, os animais foram acondicionados nas caixas de acordo com a ninhada, sob ciclo claro e escuro de 12 horas (7:00 às 19:00h), o ambiente foi mantido à temperatura constante e diária de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, com exaustão de ar. As caixas dos animais eram trocadas semanalmente, além disso, os animais tiveram alimentação e água à vontade.

Dessa forma, o estudo foi realizado seguindo as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Do Extremo Sul Catarinense sob o protocolo 61/2021 (ANEXO).

3.2 MODELO ANIMAL

Para este trabalho foram utilizados ratos expostos ao modelo de DXB, conforme descrito por Bridi et al. (2006), onde os ratos *Wistar* machos receberam um *pool* de AACR contendo leucina (190 mmol/L), isoleucina (59 mmol/L) e valina (69 mmol/L) ou salina 0,9% via subcutânea e óleo de soja ou vitamina D (100UI/kg) via gavagem. Todas as administrações foram feitas por 21 dias, duas vezes ao dia (12 em 12 horas). Além disso, optou-se por padronizar o modelo com animais do sexo masculino para que não houvesse necessidade de controle do ciclo hormonal dos animais.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O tamanho amostral deste trabalho (64 animais) foi baseado em dados da literatura. Os grupos experimentais seguem abaixo:

- Grupo 1 (n = 16): Controle (Salina (0,9%) – via subcutânea e óleo de soja via gavagem).
- Grupo 2 (n = 16): DXB (*Pool* de AACR (15,8 $\mu\text{L/g}$) - via subcutânea e óleo de soja via gavagem).

- Grupo 3 (n = 16): Vitamina D (Salina (0,9%) – via subcutânea e vitamina D D3 (100 UI/kg de peso corporal) via gavagem).
- Grupo 4 (n = 16): DXB + Vitamina D (Pool de AACR (15,8 µL/g) - via subcutâneo + vitamina D3 (100 UI/kg de peso corporal) via gavagem).

Como mostra a figura 03, o início do experimento ocorreu quando os animais completaram 7 dias de idade, sendo então iniciado o tratamento com solução salina ou AACR e óleo de soja ou vitamina D. Após 12 horas da última administração (21º dia), os animais foram submetidos aos testes comportamentais de habituação ao campo aberto e de reconhecimento de objeto novos. Em seguida, sofreram eutanásia por guilhotina e foi realizada a dissecação do córtex cerebral e retirada de sangue para posteriores análises bioquímicas.

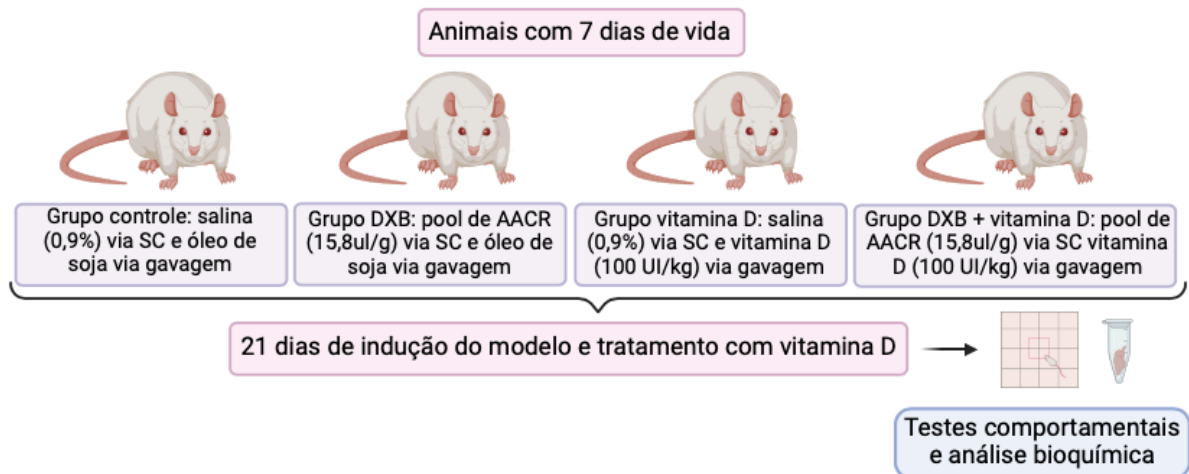


Figura 3 - Modelo experimental. Fonte: Autor, 2024

O número de animais deste experimento foi de 16 animais por grupo, já que, para realizar os testes comportamentais de campo aberto e reconhecimento de objeto foram utilizados 10 animais por grupo. Para as análises de sistema colinérgico por meio da atividade da AChE e ChAT foram utilizados 8 animais por grupo, sendo os outros 8 animais por grupo utilizados para EOX por meio das análises do conteúdo de sulfidrilas, oxidação de DCFH, níveis de TBA-RS, atividades enzimáticas da SOD e CAT. Além disso, foi retirado sangue periférico para avaliação do dano ao DNA por meio do ensaio cometa alcalino.

Vale ressaltar que os animais expostos aos testes comportamentais foram utilizados nos testes bioquímicos, pois não foi realizado nenhum teste que potencialmente poderia interferir nas análises bioquímicas.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Habituação ao campo aberto

Foi realizado em uma caixa de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual exploram livremente o ambiente por 5 minutos. O número de *crossings* (frequência com que os ratos cruzaram uma das linhas com as quatro patas) e de *rearings* (frequência com que os ratos ficam sobre as patas traseiras) foi contado (Figura 4) (Brown et al., 1999).

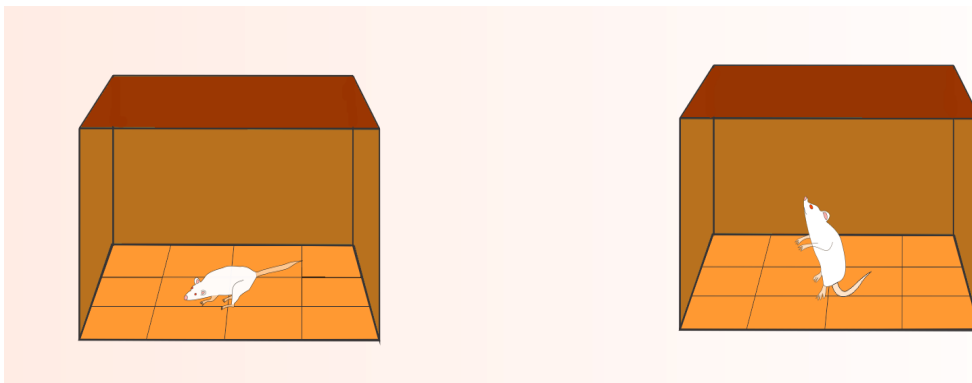


Figura 4 - Representação dos crossings e rearings no teste comportamental habituação ao campo aberto. Fonte: Autor, 2024.

3.4.2 Memória de reconhecimento de objetos

A tarefa de reconhecimento de objetos ocorreu no *open field*. Todos os animais foram submetidos a uma sessão de habituação onde exploram livremente o aparato por 5 min. Não foram colocados objetos na caixa durante o ensaio de habituação. Vinte e quatro horas após a habituação, os animais foram recolocados no aparato, no qual dois objetos idênticos (objetos A1 e A2, ambos cubos) foram posicionados em dois cantos adjacentes, a 10 cm das paredes, onde o animal explorou por 5 min. No teste de memória de reconhecimento de curta duração, 1h e 30 min após o treino, os animais foram colocados novamente no aparato e exploraram durante 5 min na presença de um objeto familiar (A) e um outro objeto novo (B, um retângulo). No teste de memória de reconhecimento de longo prazo, 24 horas após o treino, os animais foram recolocados no aparato e exploraram durante 5 min na presença de um objeto familiar (A) e um novo objeto (C, uma pirâmide). Todos os objetos possuem texturas

semelhantes (lisas), cores (azul) e tamanhos (peso 150-200 g), mas formas distintas. Um índice de reconhecimento foi calculado para cada animal durante as sessões de teste. A relação $TB / (TA + TB)$ (TA = tempo gasto explorando o objeto familiar A, TB = tempo gasto explorando o novo objeto B) e a relação $TC / (TA + TC)$ (TA = tempo gasto explorando o objeto familiar A; TC = tempo gasto explorando o novo objeto C). Entre os ensaios, os objetos foram lavados com solução de etanol a 10%. A exploração foi definida como “sniffing” (explorando o objeto 3-5 cm de distância dele) ou tocando o objeto com o nariz e/ou as patas dianteiras (Figura 5) (Barichello et al., 2007).

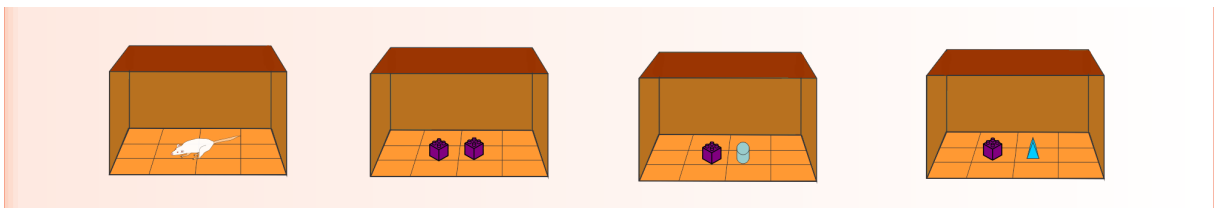


Figura 5 - Representação da memória de reconhecimento de objetos. Fonte: Autor, 2024.

3.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Foi realizado pelo método modificado de Lowry e colaboradores (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão. O princípio do método é baseado na redução do reagente Folin-Ciocalteu na presença do catalisador cobre (II) quando reage com as proteínas de uma amostra. Dessa forma, as amostras foram homogêneas na proporção 1:10, em tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM pH 7,4. Para posterior centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos a 4 °C. Para a curva padrão foi utilizada albumina bovina 1 mg/mL, 1 mL de reagente C formado pela mistura dos reagentes A, B1 e B2 (100:1:1) e água. Para as amostras foi utilizado volume de 10 uL, 1 mL de reagente C e 190 uL de água. Após pipetar todos os reagentes, foi misturado utilizando vórtex, e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Logo após, foi adicionado no escuro 100 uL do reagente Folin-Ciocalteu 1N em todas as amostras e na curva, agitado no vórtex e incubado novamente por 20 min no escuro a temperatura ambiente. Após incubação foi colocado 300uL em placa de 96 poços para realização da leitura no *spectramax* a 650 nm. Os valores estão expressos em mg.

3.6 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO:

3.6.1 Dosagem do conteúdo de sulfidrilas

Foi determinado o conteúdo de sulfidrilas de acordo com Aksenov e Markesbery (2001), sendo o princípio do método baseado na redução do reagente de cor DTNB por tióis, gerando o ânion 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB²⁻). Dessa forma, as amostras foram homogeneizadas na proporção 1:10, em tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM pH 7,4. Para posterior centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. Em uma placa de Elisa, foi preparado o branco para cada amostra, bem como, um branco reagente. Foi pipetado 12 µL de amostra e 238 µL de Tampão PBS com EDTA 1 M no branco amostra, 242,9 µL Tampão PBS com EDTA 1 M e 7,1 µL no branco reagente, será utilizado 12 µL de amostra, 230,9 µL de Tampão PBS com EDTA 1 M e 7,1 µL de DTNB, para a determinação dos conteúdos das sulfidrilas. Após pipetar o DTNB, deixa-se a placa em temperatura ambiente, protegida da luz, por 30 minutos. Após os 30 minutos ocorre a leitura em espectrofotômetro a 412 nm. Os resultados foram expressos em nmols de TNB/mg de proteína (Aksenov e Markesbery, 2001).

3.6.2 Medida da oxidação de 2',7'-Diclorofluoresceína (DCFH)

A produção de espécies reativas foi determinada de acordo com método de LeBel et al. (1992). Dessa forma, amostras foram previamente homogeneizadas, adicionando diacetato do DCF, sendo as alíquotas incubadas durante 30 minutos à 37 °C. No meio intracelular, esterases clivam o grupamento acetato do DCFH-DA, gerando a forma reduzida DCFH. Dessa forma, espécies reativas de oxigênio realizam a oxidação de dois elétrons de DCFH, produzindo o produto fluorescente 2',7'-diclofluoresceína (DCF). A fluorescência foi determinada utilizando comprimentos de onda de 488nm (excitação) e 525 nm (emissão), sendo a curva de calibração realizada utilizando-se DCF padrão (0-10 µM). Os resultados foram expressos como µmol de DCF.mg de proteína (Lebel et al., 1992).

3.6.3 Medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para analisar os níveis de TBA-RS, as amostras foram homogeneizadas na proporção 1:10, em tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM pH 7,4. Seguiu-se com a centrifugação do homogenato a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. Será pipetado 100 µL de

amostra, acrescentando-se 200 μL de TCA 10% e 300 de TBA 0,67% em cada tubo do tipo eppendorf. Posteriormente, foram tampados os mesmos com papel alumínio e foram levados a banho-maria fervente por duas horas. Após esse período, deixa-se esfriar as amostras e então adiciona-se 400 μL de butanol. Em seguida, passa-se cada tubo do tipo eppendorf em vórtex por exatos 20 segundos, seguidos de centrifugação a 5000 rpm por 3 minutos. Pipeta-se a fase superior, de cor rosa, em cubetas para realizar a leitura em fluorímetro, com medidas excitação em 515 nm e emissão 553 nm. A curva de calibração foi feita com concentração de 0 a 6 nmol/m, utiliza-se solução B, tampão de homogeneização, TCA 10% e TBA 0,67%. Os resultados foram expressos como nmol de equivalentes de malondialdeído.mg de proteína (Esterbauer e Cheeseman, 1990).

3.6.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Foram homogeneizadas as amostras na proporção 1:10, em tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM pH 7,4. Para serem centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos a 4 °C, foi armazenado o sobrenadante. Em uma placa de Elisa, pipeta-se 190 μL de tampão glicina e 5 μL de catalase no branco; 5 μL de amostra, 185 μL de tampão glicina e 5 μL de catalase para a primeira amostra; 10 μL de amostra, 180 μL de tampão glicina e 5 μL de catalase para a segunda amostra; 15 μL de amostra, 175 μL de tampão glicina e 5 μL de catalase para a terceira amostra, sendo assim, realizada uma leitura em triplicada de cada amostra. Em seguida foi realizada a leitura pontual em espectrofotômetro a 480 nm. Após isso foi pipetado 5 μL de adrenalina em todos os poços. Posteriormente, foi realizado uma nova leitura em espectrofotômetro a 412 nm durante 20 minutos, com leitura de 40 em 40 segundos. A atividade da enzima expressa foi expressa em U/mg de proteína (Bannister e Calabrese, 1987).

3.6.5 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com Aebi (1984). Os conteúdos cerebrais serão homogeneizados na proporção 1:10, em no tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM pH 7,4. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C, e coletou-se o sobrenadante. Zerou-se o equipamento com 620 μL de branco. Em seguida, foi pipetado 50 μL de amostra e 5 μL de triton 10% em tubos do tipo eppendorf. Foi agitado os tubos em vórtex, deixando-os em gelo por 15 minutos para liberação da catalase. Posteriormente, pipeta-se 20 μL de amostra em cubetas de quartzo e 600 μL do meio, a leitura

foi feita por espectrofotômetro a 240 nm durante 3 minutos de 30 em 30 segundos. A atividade da CAT foi expressa em U/mg de proteína (Aebi, 1984).

3.7 ENSAIO COMETA ALCALINO

O ensaio cometa foi realizado em ratos sob condições alcalinas, conforme descrito por Collins et al. (2023). O sangue foi coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados. As células do sangue (alíquotas de 5 μ L) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 115 μ L ou 110 μ L, respectivamente). A mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de fusão normal (1,5%) em dois pontos (50 μ L em cada ponto), coberta posteriormente com duas lamínulas (1 em cada ponto), e levada então à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana. As lâminas foram incubadas em solução alcalina (NaOH 300mM e EDTA 1mM, pH>13) por 20 minutos para desdobramento do DNA, seguido de eletroforese a \sim 1V/cm por aproximadamente 20 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA será corado com SYBR Gold (1:10.000) (Invitrogen, EUA) para posterior análise. Para avaliação dos danos, as lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência com ampliação de 200x utilizando o programa *Comet Assay IV* (Perceptive Instruments, UK), onde foram avaliadas 100 células/animal. As células foram classificadas de forma automática quanto às proporções do *tail length* (consiste na distância do meio do núcleo até o final da cauda em μ m) e *tail moment* (*tail length* x intensidade da fluorescência da cauda), através do *Tail Intensity* (%). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas (Collins et al., 2023).

3.8 AVALIAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO

3.8.1 Avaliação da atividade da AChE

A atividade da enzima AChE foi determinada através do ensaio colorimétrico. As amostras foram lavadas e ressuspensas em solução salina tamponada (PBS) (pH 7,4), sendo

o extrato total de proteína incubado com tampão fosfato (pH 7,4) e 10 mM de ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) por cinco minutos. A essa preparação, foi adicionado 8 mM de acetilcolina, sendo a absorvância lida em 412 nm durante 5 minutos. Assim, a atividade enzimática foi medida através da reação de grupamentos tióis, liberados da degradação de acetilcolina, com DTNB, sendo os resultados expressos como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Ellman, 1958).

3.8.2 Avaliação da atividade da ChAT

A atividade da enzima ChAT foi determinada apresentando algumas modificações. Neste protocolo, as amostras foram incubadas com o tampão de reação (PBS pH 7,2; acetilcoenzima A 6,2 mM; cloreto de colina 1 M, sulfato de neostigmina 0,76 mM; NaCl 3 M; EDTA 1,1 mM). A essa mistura foi adicionado 1 mM de 4,4'-ditiodipiridina (4-PDS), sendo a absorvância lida durante 20 minutos a 324 nm, em um leitor de microplaca *SpectraMax® Microplate Reader (Molecular Devices®)*. A medida da atividade enzimática ocorreu por meio da formação do conjugado de Coenzima A com 4-TP. Os resultados obtidos foram expressos em $\text{nmol}/\text{min}/\mu\text{g}$ de proteína, calculado por meio do coeficiente de extinção molar $1,98 \times 10^4$ (Chao e Wolfgram, 1973).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados comportamentais foram analisados pelo teste T para amostras pareadas e estão expressos como mediana e erro padrão da média, considerando * $p < 0,05$ comparado ao treino, sendo utilizado o *software Statistical Package for the Social Science (SPSS) 21.0*. As análises neuroquímicas foram analisadas por meio da análise de variância de duas vias ANOVA seguido de teste de Tukey como *post hoc*, sendo os dados estão expressos como média \pm desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo. Para a construção dos gráficos deste estudo, foi utilizado o *software GraphPad Prism*, versão 9.1.1

4 RESULTADOS

No presente trabalho, inicialmente analisou-se os níveis de defesa antioxidante por meio da atividade enzimática de SOD e CAT, enzimas chave no processo de remoção do ânion superóxido. Dessa forma, os resultados demonstram os efeitos da vitamina D sobre o modelo animal DXB. A partir dos resultados, na figura 6A pode-se observar um aumento da atividade da SOD no grupo vitamina D salina ($p < 0,0001$) e no grupo DXB controle ($p = 0,0159$) comparado ao grupo controle salina. Ainda, pode-se observar a aumento DXB + vitamina D comparado ao grupo controle salina ($p < 0,0001$) e ao grupo DXB controle ($p = 0,0027$). Já em relação à atividade de CAT demonstrada na figura 6B, percebeu-se diminuição no grupo vitamina D salina ($p < 0,0001$) e DXB controle ($p = 0,0019$) quando comparado ao grupo salina controle.

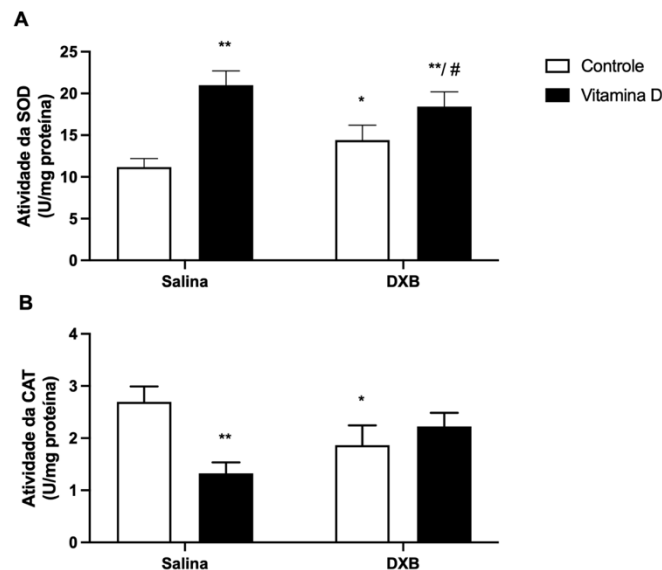


Figura 6 - Efeitos da suplementação de vitamina D sobre sistema antioxidante em um modelo animal de DXB. A) Atividade da SOD. B) Atividade da CAT. Dados expressos como média \pm desvio padrão, considerando * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ como significativo, sendo * e ** comparados ao grupo salina controle e # comparado ao grupo DXB controle. Dados analisados por ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey como *Post hoc*.

O próximo passo do estudo foi avaliar o efeito da administração de vitamina D em um modelo animal de DXB sobre os parâmetros de danos oxidativos. Na figura 7A, os resultados apontaram um aumento de DCFH nos grupos vitamina D salina ($p < 0,0001$), DXB controle ($p = 0,0176$) e DXB + vitamina D ($p < 0,0001$) quando comparados ao grupo salina controle. Ainda, aumento no grupo DXB + vitamina D ($p = 0,0082$) quando comparado ao grupo DXB controle. No conteúdo de sulfidrilas, apresentado na figura 7B, pode-se observar a

diminuição do conteúdo no grupo DXB controle ($p = 0,0374$) quando comparado ao grupo salina controle. Ademais, a suplementação de vitamina D foi capaz de reestabelecer o conteúdo de sulfidrilas no grupo DXB + vitamina D ($p = 0,0475$) quando comparado ao grupo DXB controle. Por fim, na figura 7C é possível observar aumento dos níveis de TBARS no grupo DXB controle ($p = 0,0285$) quando comparado ao grupo salina controle.

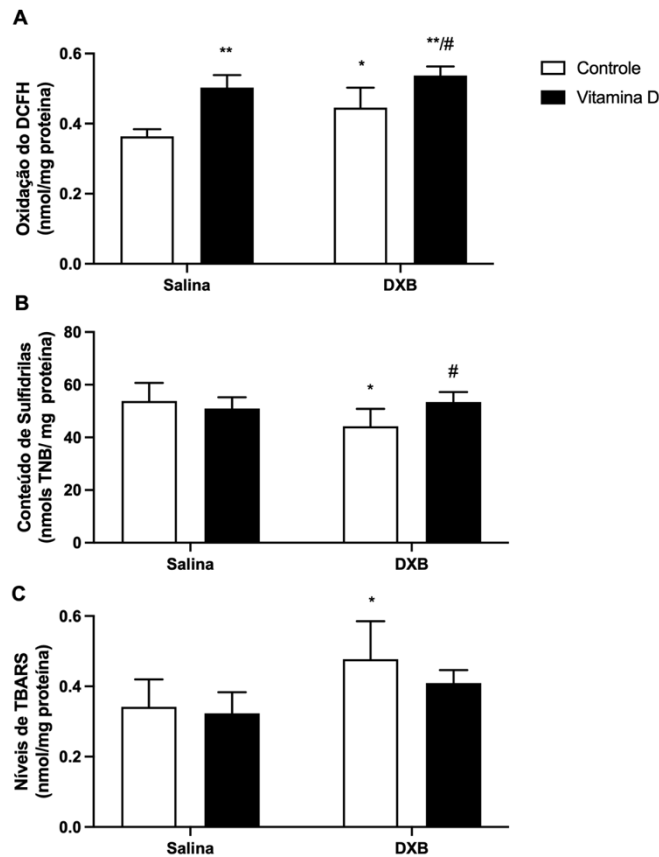


Figura 7 - Efeitos da suplementação de vitamina D sobre dano oxidativo em um modelo animal de DXB. A) Oxidação de DCFH. B) Conteúdo de sulfidrilas. C) Níveis de TBARS. Dados expressos como média \pm desvio padrão, considerando $*p < 0,05$ e $**p < 0,001$ como significativo, sendo $*$ e $**$ comparados ao grupo salina controle e $\#$ comparado ao grupo DXB controle. Dados analisados por ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey como *Post hoc*.

Ainda, foi realizado o ensaio cometa, a fim de avaliar danos ao DNA. Na figura 8, é possível observar o aumento na intensidade da cauda no grupo DXB controle ($p = 0,0003$) quando comparado ao grupo salina controle. Ademais, o tratamento com vitamina D, foi capaz de reverter o dano ocasionado pela administração dos AACR no grupo DXB + vitamina D ($p = 0,0001$).

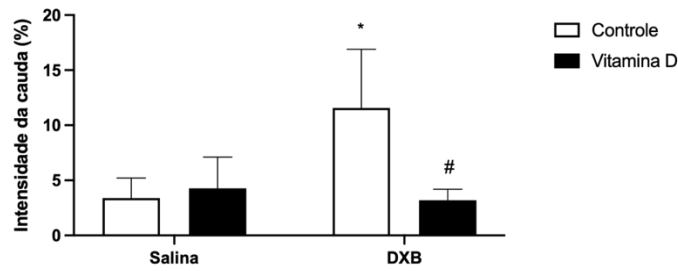


Figura 8 - Efeitos da suplementação de vitamina D sobre ensaio cometa em um modelo animal de DXB. Dados expressos como média \pm desvio padrão, considerando * $p < 0,05$ como significativo, sendo * comparados ao grupo salina controle e # comparado ao grupo DXB controle. Dados analisados por ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey como *Post hoc*.

Quanto à avaliação do sistema colinérgico, na figura 9A observa-se redução da atividade enzimática ChAT tanto no grupo vitamina D salina ($p < 0,0001$) quanto nos grupos DXB controle ($p < 0,0001$) e DXB-Vitamina D ($p < 0,0001$) quando comparados ao grupo salina controle. Com relação à atividade da enzimática da AChE é possível observar na figura 9B o aumento nos grupos vitamina D ($p = 0,0295$) salina e DXB controle ($p = 0,0055$) quando comparados ao grupo salina controle. Em adição, a suplementação de vitamina D reverteu esse aumento no grupo DXB + vitamina D ($p = 0,0027$) quando comparado ao grupo DXB controle.

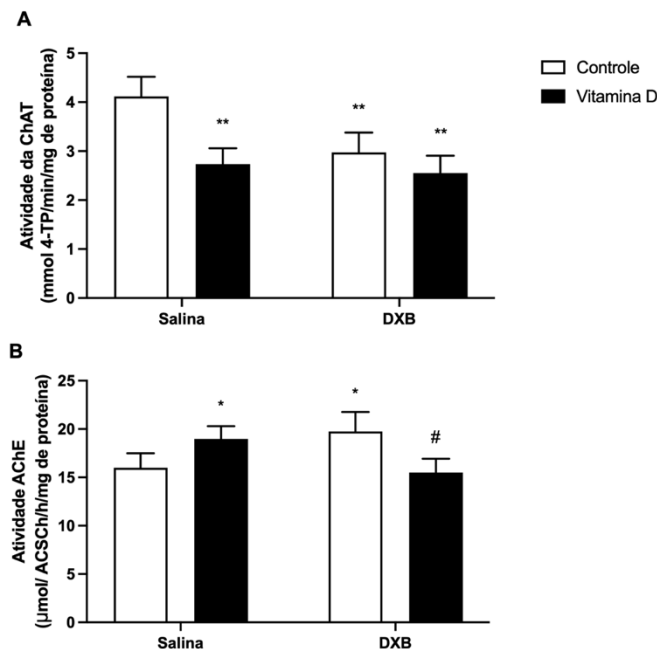


Figura 9 - Efeitos da suplementação de vitamina D sobre sistema colinérgico em um modelo animal da DXB. A) Atividade da ChAT. B) Atividade da AChE. Dados expressos como média \pm desvio padrão, considerando * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ como significativo, sendo * e ** comparados ao grupo salina controle e # comparado ao grupo DXB controle. Dados analisados por ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey como *Post hoc*.

A figura 10 apresenta os resultados obtidos pelo comportamento de habituação ao campo aberto, os resultados apontam que o número de cruzamentos (*crossings*) e de levantamentos (*rearings*) não foi estatisticamente significativo em nenhum dos grupos analisados, indicando que os animais não apresentam alterações locomotoras ou exploratórias, respectivamente.

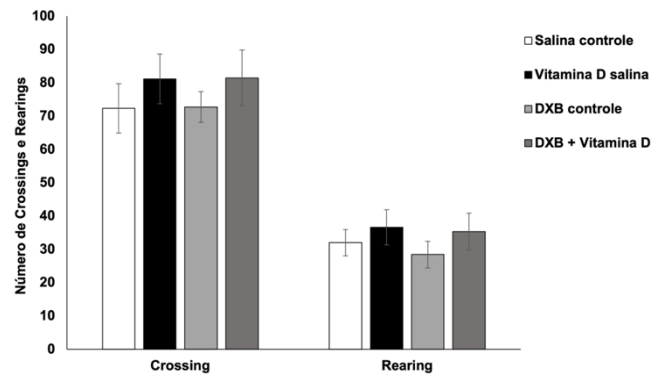


Figura 10 - Efeitos da suplementação de vitamina D sobre comportamento de habituação ao campo aberto em um modelo animal de DXB. Os dados estão expressos como média e erro padrão da média, as diferenças foram analisadas pelo teste T, considerando significativo quando $p < 0,05$.

A figura 11 demonstra os efeitos da vitamina D sobre o teste comportamental de reconhecimentos de objetos novos. Observa-se aumento significativo no índice de reconhecimento da memória de curto prazo (STM) ($p = 0,005$) e longo prazo (LTM) ($p = 0,048$) em relação ao treino no grupo salina controle, indicando preservação da memória nesses animais. Ainda, é possível observar que os grupos vitamina D salina, DXB controle e DXB + vitamina D não apresentaram diferenças em STM e LTM, indicando danos a memória de curto e longo prazo desses animais.

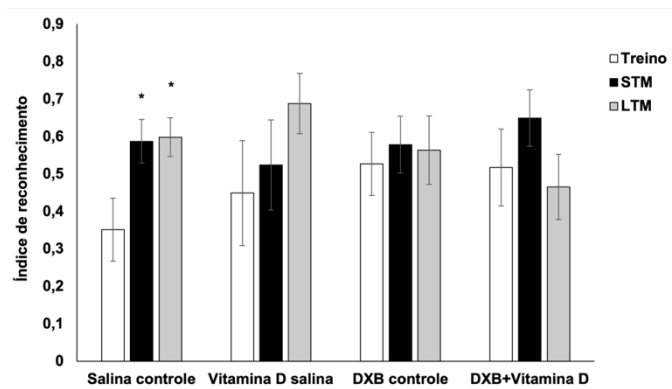


Figura 11 - Efeitos da suplementação de vitamina D sobre comportamento de reconhecimento de objetos em um modelo animal de DXB. Os dados estão expressos como média e erro padrão da média, as diferenças foram analisadas pelo teste T, considerando significativo quando $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Estudos demonstram que pacientes com DXB apresentam aumento de danos a biomoléculas, bem como, alteração de defesas antioxidantes, sendo considerado o parte da fisiopatologia dessa doença (Sitta et al., 2014). Nesse sentido, Mescka e colaboradores demonstram que pacientes com DXB apresentam aumento dos níveis de malondealdeído (MDA), indicando peroxidação lipídica, relacionados a danos em membranas celulares. Demonstram também, aumento do dano a proteínas por meio da análise de carbonilas, que ocorre para avaliar a introdução de carbonilas em resíduos de aminoácidos, levando a alteração de proteínas, podendo comprometer sua função celular. Ainda, apresentam danos ao DNA, sendo considerado esse um marcador importante visto que o DNA fica no núcleo da célula e possui papel fundamental para homeostase e mantimento das funções celulares. Por fim, demonstram diminuição de defesas antioxidantes totais, responsáveis por estabilizar as espécies reativas derivadas desses processos de oxidação à lipídios e proteínas, por exemplo (Mescka et al., 2013; Guerreiro et al., 2015; Hauschild et al., 2019).

Uma vez que esses parâmetros são afetados na doença, é observado que a administração de AACR foi capaz de alterar parâmetros de EOX no córtex cerebral de ratos, os resultados demonstram aumento na oxidação de DCFH e níveis de TBARS, assim como, diminuição do conteúdo de sulfidrilas no grupo DXB controle quando comparado ao grupo salina controle. Ainda, o tratamento com vitamina D foi capaz de aumentar a oxidação de DCFH nos grupos salina vitamina D e DXB vitamina D quando comparados ao grupo salina controle e o último, também comparado ao grupo DXB controle. No conteúdo de sulfidrilas, o tratamento com vitamina D foi capaz de reverter o dano a proteínas, ademais, não foram observadas mudanças significativas nos níveis de TBARS. No ensaio cometa realizado no sangue periférico total, foi observado aumento da intensidade da cauda do cometa no grupo DXB controle quando comparado ao grupo salina controle, ainda, no grupo tratado com vitamina D é visto a reversão do dano ao DNA ocasionado pelo acúmulo dos AACR no modelo. Ainda, foram analisadas as atividades de SOD e CAT a fim de obter dados sobre defesa antioxidante. Na atividade da SOD foi observado aumento nos grupos salina vitamina D, DXB controle e DXB vitamina D comparados ao grupo salina controle, sendo o último grupo também aumentado em relação ao grupo DXB controle. Na CAT foi observada diminuição no grupo salina vitamina D e diminuição no grupo DXB controle comparados ao grupo salina controle.

Colaborando com os achados do presente estudo, modelos animais de DXB, apresentam aumento de dano oxidativo. Dessa forma, Mescka e colaboradores, utilizando o

mesmo modelo utilizado pelo estudo, demonstram aumento dos níveis de TBARS, na oxidação de sulfidrilas e no conteúdo de carbonilas, além da diminuição da CAT e da glutathione peroxidase, indicando danos a lipídios, proteínas e defesas antioxidantes, respectivamente. A mesma autora ainda, além dos dados já apresentados, demonstra aumento na oxidação de DCFH, indicando aumento na produção de EROs e ERNs, além da diminuição de outros marcadores antioxidantes como níveis de glutathione (GSH) e da glicose-6-fosfato desidrogenase, que participam do ciclo das glutathiones a fim de estabilizar moléculas reativas (Mescka et al., 2011; Mescka et al., 2016). Ainda, no modelo animal utilizado, estudos apontam que o acúmulo de AACR leva a danos a proteínas, lipídios e maiores formações de EROs e ERNs, além da alteração na atividade de enzimas antioxidantes. Ainda, o uso de moléculas como memantina e melatonina foi capaz de melhorar esses danos a biomoléculas (Wessler et al., 2020; Duarte et al., 2023; Lemos et al., 2023). Em adição, Taschetto e colaboradores apresentam dados quanto a toxicidade do CIC, derivado da leucina no córtex cerebral de ratos, nos quais, é visto o aumento dos níveis de MDA, conteúdo de carbonilas e dano ao DNA por meio do ensaio cometa (Taschetto et al., 2017). Demonstrando então que o EOX é um fator importante na fisiopatologia da DXB e sendo essa uma ferramenta para que se possa trabalhar o uso de estratégias que visem a melhora desses parâmetros, como o realizado com o uso da vitamina D.

Dessa forma, a vitamina D é um hormônio esteroide que teve seus estudos iniciais relacionados com a regulação do metabolismo de cálcio, mas pesquisas seguintes apontaram sua ação sobre modulação e transcrição de diversos genes, estando relacionados ao desenvolvimento cerebral como diferenciação e proliferação celular, função imunológica, além de atuar na plasticidade sináptica, onde sua diminuição está associada ao aparecimento de doenças neurodegenerativas (Bivona et al., 2019; Detopoulou et al., 2023). Além disso, ainda é observado que a vitamina D está relacionada a alteração de neurotransmissores, podendo indiretamente influenciar sua produção (Máčová et al., 2017).

Nesse sentido, um estudo com vitamina D usando animais de 7 dias de vida mostra que a associação de vitamina D (0,05 ug/kg) e N-acetilcisteína (NAC) (25 mg/kg) em administração única, foi capaz de restaurar respostas antioxidantes por meio da análise da GSH e diminuir neuroinflamação por mediar a regulação dos níveis de glutamato em animais submetidos a um modelo de hipóxia (Adams et al., 2021). No estudo, Adams e colaboradores relacionaram esses dados com a rápida dispersão de vitamina D nos tecidos e de as proteínas de ligação que mantem a concentração de vitamina D estarem reduzidas em neonatos com a doença. Ainda, não foram conduzidos estudos utilizando somente a vitamina D ou NAC

sozinhos. No entanto, embora os resultados encontrados pelo estudo sejam positivos, é necessário observar que o estudo utilizou associação entre NAC e vitamina D. Ademais, os pesquisadores não observaram aumento da concentração plasmática de vitamina D após administração, podendo, os efeitos estarem mais relacionados ao NAC do que necessariamente a ação da vitamina D, ou ainda, devido a um efeito sinérgico de ambos. Vale ressaltar que já foram realizados estudos em ratos submetidos a um modelo de DXB e o tratamento com NAC e deferoxamina levou a melhora de parâmetros comportamentais relacionados a memória e anedonia, sendo esse feito relacionado a capacidade antioxidante do NAC, diminuindo EOX principalmente as EROs (Scaini, Teodorak, et al., 2012).

AlJohri e colaboradores utilizaram diferentes doses de vit. D e observaram que a dose de 0.25 µg/ml foi a concentração capaz aumentar a viabilidade celular, diminuir os níveis de MDA, aumentar a síntese de GSH e diminuir CAT em um estudo utilizando córtex cerebral de ratos de 7 dias para cultivo celular e análise dos parâmetros citados. Os pesquisadores sugerem que essa diminuição da CAT está relacionada a atividade antioxidante da vitamina D. No entanto, doses maiores que 0.25 µg/ml foram associadas com toxicidade e morte celular (AlJohri et al., 2019). Ainda Chen et al, mostra em ratos neonatos com 7 dias de vida que a administração de vit. D (0,5 ug/kg/dia) foi capaz de inibir a expressão de mediadores inflamatórios relacionados à resposta imune inata como receptores tipo *Toll-like-4* (TLR-4) e a ativação do fator nuclear kappa-B (NF-κB), em pulmão de ratos induzidos a modelo de hiperóxia. Dessa forma, o estudo aponta que a vitamina D pode modular negativamente a sinalização de TLR4/NF-κB, diminuindo a inflamação por inibir a formação de proteínas pró-inflamatórias podendo estar relacionada ao EOX, prevenindo o dano induzido pela hipóxia (Chen et al., 2015).

Em contraponto, outros estudos com ratos de diferentes idades demonstram as ações da vitamina D sobre EOX. Assim, Rodrigues e colaboradores demonstram que ratos *Wistar* machos com 90 dias submetidos a um modelo de demência esporádica induzida por streptozotocina (STZ) e tratados via gavagem com vitamina D nas doses de 12,5, 42 e 125 ug/kg durante 21 dias apresentam diminuição do dano a proteínas. No entanto, as doses de 12,5 e 42 ug/kg aumentaram os níveis do TBARS, sendo apenas diminuído na dose mais alta utilizada no estudo, esse resultado também foi observado nos níveis de GSH e na quantidade total de grupamento tiol. Embora esse resultado esteja de acordo com o que foi encontrado no presente estudo, os autores não discutem os motivos pelos quais a vitamina D apresenta essa divergência com relação a dose-efeito (Rodrigues et al., 2019).

Ainda, Mokhtari-Zaer e colaboradores, em um modelo de neuroinflamação usando lipopolissacarídeo (LPS) em ratos *Wistar* machos de 8 semanas, demonstram que o uso de vitamina D foi capaz de diminuir os níveis de MDA, aumentar o conteúdo de tióis e a atividade de SOD e CAT, estando relacionados a diminuição da interleucina-6 no hipocampo, resultando na melhora do dano cognitivo nos animais. Vale ressaltar que o artigo utilizou 3 doses de vitamina D, sendo 100, 1000 e 10000 UI/kg (Mokhtari-Zaer et al., 2020). Esses resultados estão de acordo com parte dos achados do presente estudo, uma vez que foi observado que na dose de 100 UI/kg, os animais não apresentaram diferenças na atividade da CAT, bem como apresentam melhora cognitiva nos testes comportamentais e aumento do grupo tiol, relacionado à diminuição do dano a proteínas. No entanto, não foram encontrados os mesmos resultados para o MDA e atividade da SOD, podendo estar relacionados a diferença de idade dos animais, estrutura estudada e ao modelo experimental. Isso porque os animais do estudo receberam a vitamina D por via oral duas semanas antes da administração de LPS, atuando como pré-tratamento e uma semana durante a administração de LPS, totalizando 3 semanas de tratamento. Embora seja mesmo tempo, o modelo de tratamento foi diferente, podendo ou não estar relacionado a divergência nos resultados (Mokhtari-Zaer et al., 2020). Farhangi e colaboradores, em um estudo usando ratos *Wistar* em um modelo de obesidade, tratados com vitamina D 500 UI/kg/dia durante 5 semanas demonstram que o tratamento não alterou significativamente citocinas inflamatórias e nem a atividade da CAT, aumentou a atividade da SOD, e não apresentou diferenças quanto aos níveis de MDA. Estando de acordo com os resultados obtidos, onde foi observado aumento na atividade da SOD, sem alterar CAT, ainda, não exercendo efeitos sobre dano a lipídios, analisado pelos níveis de TBARS. No entanto, embora esses dados corroborem com os achados do presente estudo, os autores não discutem os mecanismos pelos quais isso ocorre, concluindo que mais estudos são necessários para que se chegue ao entendimento do mecanismo dos resultados encontrados (Farhangi et al., 2017).

Em adição, Cetinkalp e colaboradores mostram que animais submetidos a um modelo de diabetes mellitus (DM) tipo I induzido por STZ e tratados com vitamina D3 via intraperitoneal na dose de 0.5 µg/kg, apresentam diminuição da incidência de DM relacionado a diminuição de citocinas pró-inflamatórias. Ainda, com relação à SOD, foi observado aumento na segunda semana nos grupos onde foi realizada a administração da vitamina D, possuindo aumento mais expressivo no grupo vitamina D sozinho tanto na SOD quanto na CAT. No entanto, na atividade da CAT não foi observado diferença no grupo com doença tratado com vitamina D. Os autores sugerem que esse aumento pode estar relacionados a maior formação de radicais livres, ainda, ao final de 6 semanas de tratamento com vitamina D, os animais

apresentaram diminuição da atividade de ambas as enzimas, sendo explicado pela redução do dano celular (Cetinkalp et al., 2009). Esses dados estão de acordo com os dados obtidos, uma vez que apresentam aumento da atividade da SOD, podendo estar relacionado esse aumento pelo aumento da produção de espécies reativas, avaliadas pelo aumento de DCFH. No entanto, Cetinkalp mostra que após 6 semanas de tratamento, os níveis de SOD diminuem relacionados a redução do dano celular. No entanto, com o protocolo de 21 dias utilizado no presente trabalho, não é possível observar se o tempo levaria a alteração na atividade dessa enzima. Podendo ser ainda observado que o estudo não demonstrou alteração na atividade da CAT. No entanto, vale lembrar que são protocolos com tempo, via de administração e utilizando doses diferentes.

Além disso, em um modelo de doença renal aguda em ratos *Wistar* de 8-10 semanas de idade, tratados com vitamina D 1000UI/kg/dia durante 2 semanas houve reversão do dano ao DNA, usando marcador 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, diminuição no nível da glutathione peroxidase, diminuição dos níveis de MDA e de óxido nítrico. Estando parcialmente de acordo com os resultados obtidos pelo trabalho, onde a vitamina D foi capaz de reverter o dano ao DNA. Os autores apontam que o efeito da vitamina D está relacionado à modulação da expressão gênica de fator nuclear kappa beta (NF- κ B) e do fator nuclear 2 (Nrf2), uma vez que a vitamina D evita a degradação do inibidor de NF- κ B o I κ B. Ainda, sugerem que a ação antioxidante da vitamina D, depende principalmente da atividade de seu receptor VDR, onde baixos níveis estão relacionados ao agravamento do dano oxidativo no modelo e o aumento de seus níveis estão associados a melhora do dano ao DNA e da inibição de NF- κ B. Com relação ao Nrf2, os autores mostram que esse fator está relacionado com a regulação de genes protetores envolvidos em ação antioxidante e anti-inflamatória, principalmente associado a um elemento de resposta antioxidante (ARE), dessa forma, a sinalização de Nrf2/ARE regula enzimas como CAT, SOD, glutathione peroxidase e glutathione S-transferase (Mohammed et al., 2019).

Assim, é possível sugerir que a vitamina D atua no sistema antioxidante por aumento da atividade enzimática da SOD e GSH, a fim de estabilizar os radicais livres, justificando os achados do presente estudo, onde o aumento da SOD está relacionado a uma maior produção de ERO e ERN, ainda pela vitamina D estimular a atividade da SOD. Também, é possível inferir que a diminuição da CAT no grupo salina vitamina D, pode estar relacionada a ação das glutathionas. Neste ponto, o peróxido de hidrogênio, ao invés de ser oxidado pela catalase, é desviado para sofrer ação da GSH, uma vez que estudos mostram que a vitamina D possui papel importante na formação bem como na regeneração das enzimas envolvidas no ciclo das glutathionas (Jain e Micinski, 2013; Sepidarkish et al., 2019). Entretanto, embora os

dados apontem alterações no EOX, os estudos com vitamina D neste sentido demonstram divergências quanto ao seu efeito e dose/protocolo utilizados. Juntos, esses estudos demonstram que ainda que existam dados na literatura sobre uso de vitamina D sobre parâmetros de EOX, esses dados são inconsistentes, podendo esses fatores estarem relacionados aos resultados encontrados.

Em adição, diversos estudos apresentam alterações no estado redox levando ao aparecimento de alterações comportamentais, principalmente sobre memória e aprendizado (Scaini et al., 2014; Wessler et al., 2019; Lemos et al., 2023). Parâmetros de memória e aprendizado normalmente estão associados a ação de neurotransmissores, principalmente ao glutamato que é o principal neurotransmissor excitatório do cérebro, e a acetilcolina, envolvida no processo de transmissão sináptica, plasticidade, processamento de novas informações, atenção e memória (Rauca et al., 1980). Dessa forma, estudos demonstram que alterações na neurotransmissão colinérgica podem comprometer memória, bem como, estar relacionada ao aparecimento de alterações comportamentais (Rosat et al., 1992; Winek et al., 2021). No presente estudo, foi observado diminuição da atividade da ChAT nos grupos vitamina D salina, DXB controle e DXB vitamina D quando comparados ao grupo controle salina, bem como, aumento da atividade da AChE nos grupos vitamina D salina e DXB controle quando comparados ao grupo salina controle. Além disso, no grupo DXB vitamina D foi observado diminuição na atividade da AChE quando comparado ao grupo DXB controle.

Assim, corroborando com os achados do estudo, Lemos e colaboradores demonstram que a administração de AACR gera diminuição da síntese e aumento da degradação da acetilcolina.; Ainda, os animais apresentam alterações no EOX e inflamação podendo estar relacionados ao aparecimento de alterações no sistema colinérgico, levando a disfunções na memória de animais. No estudo, foi utilizado o tratamento com memantina, sendo capaz de melhorar os parâmetros avaliados, devido ao fármaco ser um antagonista de receptores de N-metil-D-aspartato, os autores sugerem que essa melhora pode estar envolvida com a sinalização de cálcio, bem como um efeito sinérgico entre o bloqueio desses receptores e a melhora do sistema colinérgico (Lemos et al., 2023). Em adição, Scaini e colaboradores, demonstram em seu estudo que ratos Wistar submetidos a um modelo de DXB, apresentam aumento da atividade da AChE no córtex, hipocampo, estriado e soro após administração aguda e crônica de AACR. Ainda, revelam que a administração aguda dos AACR leva a diminuição da expressão da AChE no hipocampo e aumento da expressão de AChE no córtex. Os autores explicam essas divergências no hipocampo podem ocorrer por *feedback* negativo e que o aumento da expressão no córtex está diretamente ligado aos níveis da ACh (Scaini, De Rochi,

et al., 2012). Ainda, Wessler e colaboradores em peixes-zebra submetidos a altas doses de leucina, demonstraram alteração no sistema colinérgico, com aumento da atividade da AChE e diminuição da ChAT, relacionados ao aparecimento de um comportamento tipo ansioso (Wessler et al., 2019). Dessa forma, é visto que alterações no sistema colinérgico fazem parte da fisiopatologia da DXB, podendo estar relacionados ao aparecimento de alterações comportamentais.

Nesse sentido, Rastegar-Moghaddam e colaboradores mostram que ratos *Wistar* de 21 dias induzidos a um modelo de hipotireoidismo apresentam aumento dos níveis de MDA, além da diminuição da SOD e de grupamento tiol no hipocampo e córtex estando relacionados ao aumento da atividade da AChE, levando a disfunção cognitiva e conseqüentemente, danos a memória. Assim, a administração de vitamina D nesse modelo, foi capaz de diminuir MDA e aumentar a atividade da SOD e grupamento tiol, diminuir a atividade da AChE, melhorando a memória e aprendizado dos animais. Os pesquisadores sugerem que esses achados estão relacionados ao efeito protetor da vitamina D sobre memória e aprendizado devido a prevenção do dano oxidativo (Rastegar-Moghaddam et al., 2022). De acordo com os resultados encontrados, Alrefaie e Alhayani em seu estudo utilizando ratos *Wistar* machos em um modelo de DM, demonstram que a suplementação de vitamina D na dose de 500 UI/Kg/dia é capaz de melhorar a transmissão colinérgica no córtex pré-frontal, reestabelecendo a atividade da ChAT e AChE, melhorando o dano cognitivo apresentado pelo modelo. Ainda, o tratamento com vitamina D não foi capaz de alterar o tempo de exploração total dos animais, mas foi capaz de aumentar o índice de discriminação entre o objeto novo e familiar. No artigo, os autores relacionam essa melhora no índice de discriminação com o reestabelecimento da atividade colinérgica, mais especificamente com a atividade da AChE, onde baixos níveis de ACh estão relacionados a diminuição no índice de discriminação e preferência pelo objeto novo (Alrefaie e Alhayani, 2015).

Em concordância, Rodrigues e colaboradores demonstram que ratos induzidos a um modelo de demência esporádica tratados via gavagem com vitamina D nas doses de 12,5, 42 e 125 ug/kg durante 21 dias apresentam reversão do aumento da AChE quando tratados com 42 e 125 ug/kg, sendo explicado pela ação neuro-imunomoduladora da vitamina D a fim de regular os níveis da ACh (Rodrigues et al., 2019). Ainda, Jain e colaboradores apresentam dados em que a diminuição do antioxidante GSH está positivamente correlacionado com o aparecimento de declínio cognitivo em pacientes com DA. Visto isso, estudaram a associação de vitamina D e L-cisteína a fim de melhorar esses parâmetros. Os autores sugerem que ao aumentar os níveis de GSH é possível diminuir os níveis da AChE, dessa forma, aumentando a disponibilidade de

ACh e melhorando o dano cognitivo nesses pacientes (Jain et al., 2023). Os autores ainda comentam que a suplementação da vitamina D sozinha apresenta limitações quanto ao seu uso, e que a terapia combinada com L-cisteína é mais efetiva na diminuição da produção de EROs e na inibição de citocinas (Jain et al., 2021). Em contradição, Siebert e colaboradores utilizando modelo de ovariectomia em ratas *Wistar* de 90 dias mostram que a suplementação de vitamina D na dose de 500 UI/Kg por 30 dias foi capaz de reverter parcialmente alterações em parâmetros inflamatórios. No entanto, não foi capaz de reverter o aumento na atividade da AChE. No estudo, os autores relacionam esses resultados ao tempo de suplementação, mas vale ressaltar que no estudo foram utilizadas ratas e não ratos, podendo esse resultado estar relacionado ao sexo do animal (Siebert et al., 2018).

Assim, é possível sugerir que a vitamina D possui ação sobre a atividade enzimática da AChE. No entanto, são necessários mais estudos para que seja possível compreender a forma como esse hormônio age sobre essa enzima. Algumas hipóteses são apontadas por Rastegar-Moghaddam e colaboradores, onde citam que os efeitos da vitamina D sobre a atividade da AChE podem estar relacionados a seus efeitos sobre eliminação da agregação de peptídeos β -amilóide, podendo estar envolvido com homeostase do cálcio, ainda pela sinalização do elemento responsivo ao alvo de proteínas (CREB) e adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) (Rastegar-Moghaddam et al., 2022). No entanto, embora os autores tenham apresentado essas hipóteses para a redução da atividade da AChE pelo uso da vitamina D, eles não foram a fundo no estudo dessas vias e deixam claro que mais estudos são necessários.

Conforme citado anteriormente, estudos demonstram que alterações no sistema colinérgico estão relacionados ao aparecimento de alterações comportamentais em modelos animais de DXB. Assim, com relação ao comportamento de habituação ao campo aberto, os resultados demonstram que os animais não apresentaram diferenças significativas no número de cruzamentos e levantamentos, indicando que estes animais não apresentaram alterações na locomoção e exploração. No comportamento de reconhecimento de objetos, foi observado que apenas os animais do grupo salina controle apresentam aumento no índice de reconhecimento em curto e longo prazo, indicando que os animais deste grupo apresentam memória de curto e longo prazo preservadas. No entanto, os animais dos grupos salina vitamina D, DXB controle e DXB vitamina D não apresentam diferenças na memória de curto e longo prazo, indicando dano na memória nesses animais.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Lemos e colaboradores, onde animais submetidos a um modelo de DXB apresentam danos a memória de curto e longo prazo, analisado pelo teste de reconhecimento de objetos (Lemos et al., 2023). Em

concordância, Scaini e colaboradores demonstram que ratos submetidos a DXB apresentam alterações comportamentais, com danos a memória, aprendizagem, cognição, além do aparecimento de comportamento tipo depressivo, sem alteração no comportamento de habituação de campo aberto (Scaini, Teodorak, et al., 2012; Scaini et al., 2014). Ainda, peixes-zebra submetidos a altas doses de leucina apresentam alteração na memória, no comportamento social (Da Silva Lemos et al., 2022; Duarte et al., 2023). Os autores sugerem que esses resultados são relacionados a alteração na síntese de neurotransmissores, pela diminuição de aminoácidos neutros como triptofano, tirosina e fenilalanina. Isso ocorre através da competição para passagem pela barreira hematoencefálica (BHE), uma vez que, devido aos altos níveis de leucina e por esse AACR possuir maior afinidade pelo transportador, tanto a leucina, quanto o CIC atravessam a BHE com maior facilidade, levando a efeitos deletérios no cérebro, bem como, levando a diminuição de neurotransmissores envolvidos com memória e cognição (Smith et al., 1987; Wajner et al., 2000).

Nesse sentido, Rastegar-Moghaddam e colaboradores em um modelo de hipotireoidismo utilizando ratos *Wistar* de 21 dias, mostram que a suplementação com vitamina D nas doses de 100 e 500 UI/kg/dia via gavagem melhora memória e aprendizado nos testes de esquiwa passiva e no labirinto aquático de Morris. Os autores sugerem que essa melhora ocorre por diminuição da atividade da AChE e nos tecidos cerebrais dos animais (Rastegar-Moghaddam et al., 2022). Embora os resultados sejam diferentes dos encontrados, vale ressaltar que foram utilizados animais de idades diferentes, e o tempo de tratamento foi de 6 semanas. Além disso, o efeito da vitamina D na dose de 500 UI/kg/dia foi mais pronunciado quando comparado a dose de 100 UI/kg/dia. Alrefaie e Moustafa mostram que ratos *Wistar* machos submetidos a uma dieta hiperlipídica e tratados com vitamina D 500 UI/kg/dia apresentam aumento da exploração e no índice de discriminação no teste de reconhecimento de objetos relacionados a melhora da transmissão colinérgica (Alrefaie e Moustafa, 2020). Vale ressaltar que a dose e modelo utilizados no estudo é diferente da utilizada no presente estudo. Diferentemente dos artigos apresentados e em concordância com os achados do presente estudo, Siebert e colaboradores utilizando modelo de ovariectomia em ratas *Wistar* de 90 dias mostram que a suplementação de vitamina D na dose de 500 UI/Kg por 30 dias não é capaz de melhorar os danos a memória no teste de reconhecimento de objetos. Isso deixa claro que mais estudos são necessários, uma vez que os dados de suplementação da vitamina D sobre comportamento ainda permanece controverso (Siebert et al., 2017). Ainda, Pettersen aponta que a memória visuoespacial é melhorada com doses mais altas da suplementação de vitamina D, enquanto a memória verbal parece estar mais relacionada a suplementação com doses baixas, estando esses

dados de acordo com estudos observacionais que avaliam memória verbal e não verbal. No entanto, o estudo apresenta limitações principalmente devido ao baixo número de participantes e ao tipo de análises realizadas. Em contraponto, é concluído que a suplementação de vitamina D por 18 semanas pode melhorar a cognição de pacientes, principalmente com relação a memória visual, ainda, deixam claro que não existem dados quanto ao nível ideal de vitamina D para cognição, sendo necessários mais estudos para que se elucide o benefício cognitivo e dose mais eficiente da vitamina D (Pettersen, 2017).

Nesse sentido, estudos sugerem que a ação da vitamina D ocorre principalmente devido a ligação da vitamina D no seu receptor VDR. Este receptor é expresso na grande parte das células e possui localização nos mais diversos tecidos, incluindo no cérebro (Garcion et al., 2002; Bouillon et al., 2008). Assim, a ligação da vitamina D ao receptor VDR não está apenas relacionada a cascatas de sinalização, como ativação de fatores nucleares que levam ao aumento de antioxidantes, mas também, está envolvida no controle da formação de radicais livres. Ademais, estudos apontam que a vitamina D regula direta ou indiretamente diversos genes que podem estar relacionados a diversas funções celulares, dentre elas, com o reparo ao DNA, crescimento e manutenção óssea, apoptose e EOX (Eelen et al., 2004; Bossé et al., 2007; Bouillon et al., 2008). Além disso, Rodrigues e colaboradores indicam que os radicais livres e o EOX levam a danos comportamentais e ao surgimento de doenças neurodegenerativas (Rodrigues et al., 2019). Assim, Lin e colaboradores, sugerem que os efeitos da vitamina D sobre a memória e aprendizado ocorrem devido a eliminação da agregação de peptídeos B-amiloide (Lin et al., 2020), podendo ainda ocorrer por melhora dos efeitos através do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Rastegar-Moghaddam et al., 2022).

6 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, é possível inferir que a DXB é uma doença que afeta diversos sistemas, levando a oxidação de biomoléculas pelo EOX, alteração de defesas antioxidantes e em neurotransmissores, relacionados ao aparecimento de alterações no comportamento, bem como memória e cognição.

Dessa maneira, foi possível observar o aumento da atividade da SOD no grupo vitamina D salina e DXB + vitamina D comparados ao grupo controle salina e DXB + vitamina D, enquanto que em relação à atividade de CAT percebeu-se diminuição no grupo vitamina D salina e DXB controle quando comparado ao grupo salina controle. Além disso, a suplementação de vitamina D foi capaz de reestabelecer o conteúdo de sulfidrilas no grupo DXB + vitamina D quando comparado ao grupo DXB controle. Observou-se aumento dos níveis de TBARS no grupo DXB controle quando comparado ao grupo salina controle. A fim de avaliar danos ao DNA, o tratamento com vitamina D, foi capaz de reverter o dano ocasionado pela administração dos AACR no grupo DXB + vitamina D. Quanto à avaliação do sistema colinérgico, a suplementação de vitamina D foi capaz de reverter o aumento de AChE no grupo DXB + vitamina D quando comparado ao grupo DXB controle. Em relação ao teste de habituação em campo aberto os animais não apresentaram alterações locomotoras ou exploratórias. Ainda, no mesmo teste foi possível observar que os grupos vitamina D salina, DXB controle e DXB + vitamina D não apresentaram diferenças na memória de curto e de longo prazo indicando danos a memória de curto e longo prazo desses animais.

Logo, diversos estudos apresentam dados quanto ao uso da vitamina D sobre EOX, sistema colinérgico e comportamento, porém apresentam divergências quanto à idade dos animais, doses e vias utilizados. Desse modo, o uso de vitamina D parece ser promissor, uma vez que diversas pesquisas apresentam efeitos benéficos, porém, a dose para neonatos ainda não é estabelecida, uma vez que os artigos utilizam diferentes doses e frequência de administração. Com isso, pode-se concluir que mais estudos são necessários para se tenha entendimento sobre seus efeitos na DXB.

REFERÊNCIAS

- Adams LE, HG Moss, DW Lowe, T Brown, DB Wiest, BW Hollis, I Singh e DD Jenkins. NAC and Vitamin D Restore CNS Glutathione in Endotoxin-Sensitized Neonatal Hypoxic-Ischemic Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2021; 10: (3):
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 121-6.
- Aksenov MY e WR Markesbery. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2001; 302: (2-3): 141-5.
- Aljohri R, M Alokail e SH Haq. Neuroprotective role of vitamin D in primary neuronal cortical culture. *eNeurologicalSci*. 2019; 14: 43-8.
- Alloway K. Neuroscience Dale Purves George J. Augustine David Fitzpatrick Lawrence C. Katz Anthony-Samuel LaMantia James O. McNamara S. Mark Williams. *Quarterly Review of Biology - QUART REV BIOL*. 2001; 76:
- Alrefaie Z e AE Alhayani. Vitamin D3 improves decline in cognitive function and cholinergic transmission in prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Behavioural Brain Research*. 2015; 287: 156-62.
- Alrefaie Z e I Moustafa. Vitamin D3 favorable outcome on recognition memory and prefrontal cortex expression of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in experimental model of chronic high-fat feeding. *Int J Neurosci*. 2020; 130: (3): 262-9.
- Amâncio F, F Scalco e C Coelho. Investigação diagnóstica de erros inatos do metabolismo em um hospital universitário. *Jornal Brasileiro De Patologia E Medicina Laboratorial*. 2007; 43:
- Amaral AU e M Wajner. Pathophysiology of maple syrup urine disease: Focus on the neurotoxic role of the accumulated branched-chain amino acids and branched-chain α -keto acids. *Neurochem Int*. 2022; 157: 105360.
- Ames BN, MK Shigenaga e TM Hagen. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: (17): 7915-22.
- Annweiler C. Vitamin D in dementia prevention. *Ann N Y Acad Sci*. 2016; 1367: (1): 57-63.
- Annweiler C, E Dursun, F Féron, D Gezen-Ak, AV Kalueff, T Littlejohns, DJ Llewellyn, P Millet, T Scott, KL Tucker, S Yilmazer e O Beauchet. 'Vitamin D and cognition in older adults': updated international recommendations. *J Intern Med*. 2015; 277: (1): 45-57.
- Araújo C, V Santos e A Gonsalves. Acetylcholinesterase - AChE: A Pharmacological Interesting Enzyme. *Revista Virtual de Química*. 2016; 8: 1818-34.
- Araújo P, GF Wassermann, K Tallini, V Furlanetto, CR Vargas, CM Wannmacher, CS Dutra-Filho, AT Wyse e M Wajner. Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem Int*. 2001; 38: (6): 529-37.

Arnold GL. Inborn errors of metabolism in the 21(st) century: past to present. *Ann Transl Med.* 2018; 6: (24): 467.

Atwal PS, C Macmurdo e PC Grimm. Haemodialysis is an effective treatment in acute metabolic decompensation of maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab Rep.* 2015; 4: 46-8.

Bannister JV e L Calabrese. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987; 32: 279-312.

Barbosa BP. Terapia nutricional na depressão – como nutrir a saúde mental: uma revisão bibliográfica *Brazilian Journal of Development.* 2020; 6: (12): 100617–32.

Barichello T, MR Martins, A Reinke, LS Constantino, RA Machado, SS Valvassori, JC Moreira, J Quevedo e F Dal-Pizzol. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40: (6): 831-7.

Barker G e J Ellory. The identification of neutral amino acid transport systems. *Experimental Physiology.* 1990; 75: (1): 3-26.

Barschak AG, A Sitta, M Deon, AT Barden, CS Dutra-Filho, M Wajner e CR Vargas. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab Brain Dis.* 2008; 23: (1): 71-80.

Beaudet AL, CR Scriver, William, Sly e D Valle. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B., eds., 8th ed., McGraw-Hill, New-York, 2001, 7012 p., \$550.00). *Biochemistry (Moscow).* 2004; 67: 611-2.

Berridge MJ. Vitamin D and Depression: Cellular and Regulatory Mechanisms. *Pharmacol Rev.* 2017; 69: (2): 80-92.

Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol.* 2014; 21: (3): 319-29.

Bivona G, CM Gambino, G Iacolino e M Ciaccio. Vitamin D and the nervous system. *Neurol Res.* 2019; 41: (9): 827-35.

Blackburn PR, JM Gass, FPE Vairo, KM Farnham, HK Atwal, S Macklin, EW Klee e PS Atwal. Maple syrup urine disease: mechanisms and management. *Appl Clin Genet.* 2017; 10: 57-66.

Bonnefoy M, J Drai e T Kostka. [Antioxidants to slow aging, facts and perspectives]. *Presse Med.* 2002; 31: (25): 1174-84.

Bossé Y, K Maghni e TJ Hudson. $1\alpha,25$ -Dihydroxy-vitamin D3 stimulation of bronchial smooth muscle cells induces autocrine, contractility, and remodeling processes. *Physiological Genomics.* 2007; 29: (2): 161-8.

Bouillon R, G Carmeliet, L Verlinden, E Van Etten, A Verstuyf, HF Luderer, L Lieben, C Mathieu e M Demay. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008; 29: (6): 726-76.

Brasil (2021). LEI Nº 14.154, DE 26 DE MAIO DE 2021. Nacional PdC. Brasília, Diário Oficial da União: 1.

Bridi R, J Araldi, MB Sgarbi, CG Testa, K Durigon, M Wajner e CS Dutra-Filho. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Dev Neurosci.* 2003; 21: (6): 327-32.

Bridi R, CA Braun, GK Zorzi, CM Wannmacher, M Wajner, EG Lissi e CS Dutra-Filho. alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defences in cerebral cortex from young rats. *Metab Brain Dis.* 2005; 20: (2): 155-67.

Brown RE, SC Corey e AK Moore. Differences in Measures of Exploration and Fear in MHC-Congenic C57BL/6J and B6-H-2K Mice. *Behavior Genetics.* 1999; 29: (4): 263-71.

Brunetti-Pierri N, B Lanpher, A Erez, EA Ananieva, M Islam, JC Marini, Q Sun, C Yu, M Hegde, J Li, RM Wynn, DT Chuang, S Hutson e B Lee. Phenylbutyrate therapy for maple syrup urine disease. *Hum Mol Genet.* 2011; 20: (4): 631-40.

Burrage LC, SC Nagamani, PM Campeau e BH Lee. Branched-chain amino acid metabolism: from rare Mendelian diseases to more common disorders. *Hum Mol Genet.* 2014; 23: (R1): R1-8.

Carakushansky G. Doenças genéticas em pediatria. Published Place published: 2022.

Cetinkalp S, Y Delen, M Karadeniz, G Yüce e C Yilmaz. The effect of 1alpha,25(OH)2D3 vitamin over oxidative stress and biochemical parameters in rats where Type 1 diabetes is formed by streptozotocin. *J Diabetes Complications.* 2009; 23: (6): 401-8.

Chao LP e F Wolfgram. Purification and some properties of choline acetyltransferase (EC 2.3.1.6) from bovine brain. *J Neurochem.* 1973; 20: (4): 1075-81.

Chen Y, Q Li, Y Liu, L Shu, N Wang, Y Wu, X Sun e L Wang. Attenuation of hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats by 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3. *Exp Lung Res.* 2015; 41: (6): 344-52.

Chesney RW. The five paradoxes of vitamin D and the importance of sunscreen protection. *Clin Pediatr (Phila).* 2012; 51: (9): 819-27.

Chuang DT, JL Chuang e RM Wynn. Lessons from genetic disorders of branched-chain amino acid metabolism. *J Nutr.* 2006; 136: (1 Suppl): 243s-9s.

Chuang DT, VE Shih e R Max Wynn. Maple Syrup Urine Disease (Branched-Chain Ketoaciduria). In: Valle DL, Antonarakis S, Ballabio A, Beaudet AL e Mitchell GA. Book title. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2019.

Chuang JL, RM Wynn, CC Moss, JL Song, J Li, N Awad, H Mandel e DT Chuang. Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple syrup urine disease patients: a proposed mechanism for the thiamin-responsive phenotype. *J Biol Chem.* 2004; 279: (17): 17792-800.

Collins A, P Møller, G Gajski, S Vodenková, A Abdulwahed, D Anderson, EE Bankoglu, S Bonassi, E Boutet-Robinet, G Brunborg, C Chao, MS Cooke, C Costa, S Costa, A Dhawan, J De Lapuente, CD Bo, J Dubus, M Dusinska, SJ Duthie, NE Yamani, B Engelward, I Gaivão, L Giovannelli, R Godschalk, S Guilherme, KB Gutzkow, K Habas, A Hernández, O Herrero, M Isidori, AN Jha, S Knasmüller, IM Kooter, G Koppen, M Kruszewski, C Ladeira, B Laffon, M Larramendy, LL Hégarat, A Lewies, A Lewinska, GE Liwyszyc, AL De Cerain, M Manjanatha, R Marcos, M Milić, VM De Andrade, M Moretti, D Muruzabal, M Novak, R Oliveira, AK Olsen, N Owiti, M Pacheco, AK Pandey, S Pfuhler, B Pourrut, K Reisinger, E Rojas, E Rundén-Pran, J Sanz-Serrano, S Shaposhnikov, V Sipinen, K Smeets, H Stopper, JP Teixeira, V Valdíglesias, M Valverde, F Van Acker, FJ Van Schooten, M Vasquez, JF Wentzel, M Wnuk, A Wouters, B Žegura, T Zikmund, SaS Langie e A Azqueta. Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nat Protoc.* 2023; 18: (3): 929-89.

Da Silva Lemos I, LB Wessler, MB Duarte, GL Da Silva, HT Bernardo, G Candiotta, CA Torres, F Petronilho, EP Rico e EL Streck. Exposure to leucine alters glutamate levels and leads to memory and social impairment in zebrafish. *Metab Brain Dis.* 2022;

Dancis J, M Levitz e RG Westall. Maple syrup urine disease: branched-chain keto-aciduria. *Pediatrics.* 1960; 25: 72-9.

Danner D, SK Lemmon, J Besharse e L Elsas. Purification and characterization of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry.* 1979; 254: (12): 5522-6.

De Lonlay P, R Posset, U Mütze, K Mention, D Lamireau, M Schiff, A Servais, JB Arnoux, A Brassier, M Dao, C Douillard, C Ottolenghi, C Pontoizeau, F Miotto e J Le Mouhaër. Real-world management of maple syrup urine disease (MSUD) metabolic decompensations with branched chain amino acid-free formulas in France and Germany: A retrospective observational study. *JIMD Rep.* 2021; 59: (1): 110-9.

Delanty N e MA Dichter. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurologica Scandinavica.* 1998; 98: (3): 145-53.

Deon M, G Guerreiro, J Girardi, G Ribas e CR Vargas. Treatment of maple syrup urine disease: Benefits, risks, and challenges of liver transplantation. *Int J Dev Neurosci.* 2023; 83: (6): 489-504.

Detopoulou P, G Voulgaridou, A Saridaki, I Pylarinou, E-M Argyris, V Dedes, C Giaginis, GI Panoutsopoulos e SK Papadopoulou. Vitamin D in Parkinson's disease: A systematic review of randomized controlled trials. *Clinical Nutrition Open Science.* 2023; 52: 1-13.

Dodd PR, SH Williams, AL Gundlach, PA Harper, PJ Healy, JA Dennis e GA Johnston. Glutamate and gamma-aminobutyric acid neurotransmitter systems in the acute phase of

maple syrup urine disease and citrullinemia encephalopathies in newborn calves. *J Neurochem.* 1992; 59: (2): 582-90.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82: (1): 47-95.

Duarte MB, BZ Medeiros, I Da Silva Lemos, GL Da Silva, CG Alano, ER Dondossola, CA Torres, PS Effting, EP Rico e EL Streck. Melatonin improves behavioral parameters and oxidative stress in zebrafish submitted to a leucine-induced MSUD protocol. *Metab Brain Dis.* 2023; 38: (6): 2105-14.

Dursun E, D Gezen-Ak e S Yilmazer. A novel perspective for Alzheimer's disease: vitamin D receptor suppression by amyloid- β and preventing the amyloid- β induced alterations by vitamin D in cortical neurons. *J Alzheimers Dis.* 2011; 23: (2): 207-19.

Eelen G, L Verlinden, M Van Camp, P Van Hummelen, K Marchal, B De Moor, C Mathieu, G Carmeliet, R Bouillon e A Verstuyf. The effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on the expression of DNA replication genes. *J Bone Miner Res.* 2004; 19: (1): 133-46.

Eisenstein RS, G Hoganson, RH Miller e AE Harper. Altered phosphorylation state of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase in a branched-chain acyltransferase deficient human fibroblast cell line. *J Inherit Metab Dis.* 1991; 14: (1): 37-44.

Ellman GL. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1958; 74: (2): 443-50.

Esterbauer H e KH Cheeseman. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 407-21.

Farhangi MA, M Mesgari-Abbasi, G Hajiluian, G Nameni e P Shahabi. Adipose Tissue Inflammation and Oxidative Stress: the Ameliorative Effects of Vitamin D. *Inflammation.* 2017; 40: (5): 1688-97.

Feldman D, BCJ Van Der Eerden, PJ Malloy e WL Miller. Chapter 39 - Genetic Disorders Of Vitamin D Synthesis and Action. In: Thakker RV, Whyte MP, Eisman JA e Igarashi T. Book title. Academic Press; 2018. 735-59.

Fisher CR, CW Fisher, DT Chuang e RP Cox. Occurrence of a Tyr393----Asn (Y393N) mutation in the E1 α gene of the branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex in maple syrup urine disease patients from a Mennonite population. *Am J Hum Genet.* 1991; 49: (2): 429-34.

Frazier DM, C Allgeier, C Homer, BJ Marriage, B Ogata, F Rohr, PL Splett, A Stembridge e RH Singh. Nutrition management guideline for maple syrup urine disease: an evidence- and consensus-based approach. *Mol Genet Metab.* 2014; 112: (3): 210-7.

Garcion E, N Wion-Barbot, CN Montero-Menei, F Berger e D Wion. New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; 13: (3): 100-5.

Garrod A. The Croonian lectures on inborn errors of metabolism. *The Lancet*. 1908; 172: (4427): 1-7.

Garrod AE. *Inborn errors of metabolism*. Published (H. Frowde and Hodder & Stoughton). Place published: H. Frowde and Hodder & Stoughton; 1923.

Gibson GE e JP Blass. Inhibition of acetylcholine synthesis and of carbohydrate utilization by maple-syrup-urine disease metabolites. *J Neurochem*. 1976; 26: (6): 1073-8.

Goulart P, L Caruso, N Nadur, D Portella, A Kummerle e R Lacerda. Butyrylcholinesterase - BuChE: A Potential Target for Development of Drugs for Alzheimer's Disease Treatment. *Revista Virtual de Química*. 2020; 13:

Guerreiro G, CP Mescka, A Sitta, B Donida, D Marchetti, T Hammerschmidt, J Faverzani, M Coelho Dde, M Wajner, CS Dutra-Filho e CR Vargas. Urinary biomarkers of oxidative damage in Maple syrup urine disease: the L-carnitine role. *Int J Dev Neurosci*. 2015; 42: 10-4.

Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994; 344: (8924): 721-4.

Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*. 1996; 16: 33-50.

Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 2006; 97: (6): 1634-58.

Halliwell B e S Chirico. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993; 57: (5 Suppl): 715S-24S; discussion 24S-25S.

Halliwell B e JMC Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Published (Oxford University Press). Place published: Oxford University Press; 2015.

Harris RA, M Joshi, NH Jeoung e M Obayashi. Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *J Nutr*. 2005; 135: (6 Suppl): 1527s-30s.

Harris-Haman P, L Brown, S Massey e S Ramamoorthy. Implications of Maple Syrup Urine Disease in Newborns. *Nurs Womens Health*. 2017; 21: (3): 196-206.

Hauschild TC, G Guerreiro, CP Mescka, DM Coelho, L Steffens, DJ Moura, V Manfredini e CR Vargas. DNA damage induced by allosioleucine and other metabolites in maple syrup urine disease and protective effect of l-carnitine. *Toxicol In Vitro*. 2019; 57: 194-202.

Herber S, IV Schwartz, T Nalin, CB Oliveira Netto, JS Camelo Junior, ML Santos, EM Ribeiro, L Schüler-Faccini e CF Souza. Maple syrup urine disease in Brazil: a panorama of the last two decades. *J Pediatr (Rio J)*. 2015; 91: (3): 292-8.

Hossein-Nezhad A e MF Holick. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc*. 2013; 88: (7): 720-55.

Huang Y, HR Zielke, JT Tildon, CL Zielke e PJ Baab. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: leucine infusion. *Dev Neurosci.* 1996; 18: (5-6): 415-9.

Jain SK e D Micinski. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2013; 437: (1): 7-11.

Jain SK, D Micinski e R Parsanathan. l-Cysteine Stimulates the Effect of Vitamin D on Inhibition of Oxidative Stress, IL-8, and MCP-1 Secretion in High Glucose Treated Monocytes. *J Am Coll Nutr.* 2021; 40: (4): 327-32.

Jain SK, CM Stevens, JJ Margret e SN Levine. Alzheimer's Disease: A Review of Pathology, Current Treatments, and the Potential Therapeutic Effect of Decreasing Oxidative Stress by Combined Vitamin D and l-Cysteine Supplementation. *Antioxid Redox Signal.* 2023;

Karam PE, MZ Habbal, MA Mikati, GE Zaatari, NK Cortas e RT Daher. Diagnostic challenges of aminoacidopathies and organic acidemias in a developing country: a twelve-year experience. *Clin Biochem.* 2013; 46: (18): 1787-92.

Landel V, P Millet, K Baranger, B Loriod e F Féron. Vitamin D interacts with Esr1 and Igf1 to regulate molecular pathways relevant to Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2016; 11: 22.

Lebel CP, H Ischiropoulos e SC Bondy. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992; 5: (2): 227-31.

Lemos IDS, CA Torres, CG Alano, RT Matiola, R De Figueiredo Seldenreich, APZ Padilha, E De Pieri, PS Effting, RA Machado-De-Ávila, GZ Réus, G Leipnitz e EL Streck. Memantine Improves Memory and Neurochemical Damage in a Model of Maple Syrup Urine Disease. *Neurochem Res.* 2023;

Libuda L, BH Laabs, C Ludwig, J Bühlmeier, J Antel, A Hinney, R Naresh, M Föcker, J Hebebrand, IR König e T Peters. Vitamin D and the Risk of Depression: A Causal Relationship? Findings from a Mendelian Randomization Study. *Nutrients.* 2019; 11: (5):

Lin CI, YC Chang, NJ Kao, WJ Lee, TW Cross e SH Lin. 1,25(OH)(2)D(3) Alleviates A β (25-35)-Induced Tau Hyperphosphorylation, Excessive Reactive Oxygen Species, and Apoptosis Through Interplay with Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Signaling in SH-SY5Y Cells. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: (12):

Máčová L, M Bičíková, D Ostatníková, M Hill e L Stárka. Vitamin D, neurosteroids and autism. *Physiol Res.* 2017; 66: (Suppl 3): S333-s40.

Mallmann MB, YT Tomasi e AF Boing. Neonatal screening tests in Brazil: prevalence rates and regional and socioeconomic inequalities. *Jornal de Pediatria.* 2020; 96:

Marques CDL, AT Dantas, TS Fragoso e ÂLBP Duarte. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2010; 50:

Menkes JH, PL Hurst e JM Craig. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics*. 1954; 14: (5): 462-7.

Mescka C, T Moraes, A Rosa, P Mazzola, B Piccoli, C Jacques, G Dalazen, J Coelho, M Cortes, M Terra, C Regla Vargas e CS Dutra-Filho. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis*. 2011; 26: (1): 21-8.

Mescka CP, D De Moura Coelho, A Sitta, F Catarino, B Donida, AP Rosa, EA Gonzalez, CV Pinheiro, F Poletto, G Baldo, CS Dutra-Filho e CR Vargas. Preliminary results of PBA-loaded nanoparticles development and the effect on oxidative stress and neuroinflammation in rats submitted to a chemically induced chronic model of MSUD. *Metab Brain Dis*. 2021; 36: (5): 1015-27.

Mescka CP, G Guerreiro, T Hammerschmidt, J Faverzani, D De Moura Coelho, V Manfredini, CA Wayhs, M Wajner, CS Dutra-Filho e CR Vargas. L-Carnitine supplementation decreases DNA damage in treated MSUD patients. *Mutat Res*. 2015; 775: 43-7.

Mescka CP, AP Rosa, G Schirmbeck, TH Da Rosa, F Catarino, LO De Souza, G Guerreiro, A Sitta, CR Vargas e CS Dutra-Filho. L-carnitine Prevents Oxidative Stress in the Brains of Rats Subjected to a Chemically Induced Chronic Model of MSUD. *Mol Neurobiol*. 2016; 53: (9): 6007-17.

Mescka CP, CA Wayhs, CS Vanzin, GB Biancini, G Guerreiro, V Manfredini, C Souza, M Wajner, CS Dutra-Filho e CR Vargas. Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: l-carnitine effect. *Int J Dev Neurosci*. 2013; 31: (1): 21-4.

Mesulam MM, A Guillozet, P Shaw, A Levey, EG Duysen e O Lockridge. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*. 2002; 110: (4): 627-39.

Ministério Da Saúde B. Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal Published (Secretaria de Assistência à Saúde). Place published: Secretaria de Assistência à Saúde; 2002.

Mitri J, MD Muraru e AG Pittas. Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. *Eur J Clin Nutr*. 2011; 65: (9): 1005-15.

Mohammed MA, BE Aboulhoda e RH Mahmoud. Vitamin D attenuates gentamicin-induced acute renal damage via prevention of oxidative stress and DNA damage. *Hum Exp Toxicol*. 2019; 38: (3): 321-35.

Mokhtari-Zaer A, M Hosseini, H Salmani, Z Arab e P Zareian. Vitamin D3 attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in rats by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Life Sciences*. 2020; 253: 117703.

- Morton DH, KA Strauss, DL Robinson, EG Puffenberger e RI Kelley. Diagnosis and Treatment of Maple Syrup Disease: A Study of 36 Patients. *Pediatrics*. 2002; 109: (6): 999-1008.
- Mpandzou G, E Aït Ben Haddou, W Regragui, A Benomar e M Yahyaoui. Vitamin D deficiency and its role in neurological conditions: A review. *Rev Neurol (Paris)*. 2016; 172: (2): 109-22.
- Muelly ER, GJ Moore, SC Bunce, J Mack, DC Bigler, DH Morton e KA Strauss. Biochemical correlates of neuropsychiatric illness in maple syrup urine disease. *J Clin Invest*. 2013; 123: (4): 1809-20.
- Nellis MM e DJ Danner. Gene preference in maple syrup urine disease. *Am J Hum Genet*. 2001; 68: (1): 232-7.
- Peinemann F e DJ Danner. Maple syrup urine disease 1954 to 1993. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 1994; 17: (1): 3-15.
- Peters BS, LC Dos Santos, M Fisberg, RJ Wood e LA Martini. Prevalence of vitamin D insufficiency in Brazilian adolescents. *Ann Nutr Metab*. 2009; 54: (1): 15-21.
- Pettersen JA. Does high dose vitamin D supplementation enhance cognition?: A randomized trial in healthy adults. *Experimental Gerontology*. 2017; 90: 90-7.
- Piccioletto Marina r, Michael j Higley e Yann s Mineur. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron*. 2012; 76: (1): 116-29.
- Piri-Moghadam H, A Miller, D Pronger, F Vicente, J Charrow, S Haymond e DC Lin. A rapid LC-MS/MS assay for detection and monitoring of underivatized branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *J Mass Spectrom Adv Clin Lab*. 2022; 24: 107-17.
- Porto CM, T De Paula Santana Da Silva e EB Sougey. Contribuições da vitamina D no tratamento de sintomas depressivos e fatores de risco cardiovascular: protocolo de estudo para um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo. *Trials*. 2019; 20: (1): 583.
- Prado MA, RA Reis, VF Prado, MC De Mello, MV Gomez e FG De Mello. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem Int*. 2002; 41: (5): 291-9.
- Prado VF, H Janickova, MA Al-Onaizi e MA Prado. Cholinergic circuits in cognitive flexibility. *Neuroscience*. 2017; 345: 130-41.
- Premaor MO e TW Furlanetto. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2006; 50:
- Puffenberger EG. Genetic heritage of the Old Order Mennonites of southeastern Pennsylvania. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2003; 121c: (1): 18-31.

- Quental S, S Macedo-Ribeiro, R Matos, L Vilarinho, E Martins, EL Teles, E Rodrigues, L Diogo, P Garcia, F Eusébio, A Gaspar, S Sequeira, F Furtado, I Lança, A Amorim e MJ Prata. Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. *Mol Genet Metab.* 2008; 94: (2): 148-56.
- Rastegar-Moghaddam SH, M Hosseini, F Alipour, A Rajabian e A Ebrahimzadeh Bideskan. The effects of vitamin D on learning and memory of hypothyroid juvenile rats and brain tissue acetylcholinesterase activity and oxidative stress indicators. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2022; 395: (3): 337-51.
- Rauca C, E Kammerer e H Matthies. Choline uptake and permanent memory storage. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 1980; 13: (1): 21-5.
- Reed LJ e ML Hackert. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *J Biol Chem.* 1990; 265: (16): 8971-4.
- Reis M, M Farage e H Wolosker. Chloride-dependent inhibition of vesicular glutamate uptake by alpha-keto acids accumulated in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1475: (2): 114-8.
- Rodrigues MV, JM Gutierrez, F Carvalho, TF Lopes, V Antunes, P Da Costa, ME Pereira, MRC Schetinger, VM Morsch e CM De Andrade. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of Vitamin D(3) ameliorating memory dysfunction in sporadic dementia of Alzheimer's type. *Redox Rep.* 2019; 24: (1): 34-40.
- Rosat R, RC Da-Silva, MS Zanatta, JH Medina e I Izquierdo. Memory consolidation of a habituation task: role of N-methyl-D-aspartate, cholinergic muscarinic and GABA-A receptors in different brain regions. *Braz J Med Biol Res.* 1992; 25: (3): 267-73.
- Salvador M e JaP Henriques. *Radicais Livres E a Resposta Celular Ao Estresse Oxidativo.* Published (Editora da ULBRA). Place published: Editora da ULBRA; 2004.
- Saudubray J-M e C Charpentier. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Valle DL, Antonarakis S, Ballabio A, Beaudet AL e Mitchell GA. Book title. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2019.
- Saudubray JM e A Garcia-Cazorla. An overview of inborn errors of metabolism affecting the brain: from neurodevelopment to neurodegenerative disorders. *Dialogues Clin Neurosci.* 2018; 20: (4): 301-25.
- Saudubray JM e À Garcia-Cazorla. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatr Clin North Am.* 2018; 65: (2): 179-208.
- Scaini G, N De Rochi, IC Jeremias, PF Deroza, AI Zugno, TC Pereira, GM Oliveira, LW Kist, MR Bogo, PF Schuck, GC Ferreira e EL Streck. Evaluation of acetylcholinesterase in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol Neurobiol.* 2012; 45: (2): 279-86.
- Scaini G, GC Jeremias, CB Furlanetto, D Dominghini, CM Comim, J Quevedo, PF Schuck, GC Ferreira e EL Streck. Behavioral responses in rats submitted to chronic administration of branched-chain amino acids. *JIMD Rep.* 2014; 13: 159-67.

Scaini G, BP Teodorak, IC Jeremias, MO Morais, F Mina, D Dominguini, B Pescador, CM Comim, PF Schuck, GC Ferreira, J Quevedo e EL Streck. Antioxidant administration prevents memory impairment in an animal model of maple syrup urine disease. *Behav Brain Res.* 2012; 231: (1): 92-6.

Scaini G, T Tonon, CFM De Souza, PF Schuk, GC Ferreira, JS Neto, T Amorin, IVD Schwartz e EL Streck. Serum Markers of Neurodegeneration in Maple Syrup Urine Disease. *Mol Neurobiol.* 2017; 54: (7): 5709-19.

Schadewaldt P, A Bodner-Leidecker, HW Hammen e U Wendel. Significance of L-alloisoleucine in plasma for diagnosis of maple syrup urine disease. *Clin Chem.* 1999; 45: (10): 1734-40.

Schadewaldt P e U Wendel. Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr.* 1997; 156 Suppl 1: S62-6.

Sepidarkish M, F Farsi, M Akbari-Fakhrabadi, N Namazi, A Almasi-Hashiani, A Maleki Hagiagha e J Heshmati. The effect of vitamin D supplementation on oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Pharmacological Research.* 2019; 139: 141-52.

Serra J, F Sánchez e F Visus. Enfermedades de orina de jarabe arce. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 3a ed. Madrid: Ediciones Ergon. 2010; 487-98.

Siebert C, CG Bertó, FS Ferreira, DS Moreira, TM Dos Santos e ATS Wyse. Vitamin D partially reverses the increase in p-NF- κ B/p65 immunocontent and interleukin-6 levels, but not in acetylcholinesterase activity in hippocampus of adult female ovariectomized rats. *Int J Dev Neurosci.* 2018; 71: 122-9.

Siebert C, P Pierozan, J Kolling, TM Dos Santos, MC Sebotiao, EP Marques, H Biasibetti, A Longoni, F Ferreira, R Pessoa-Pureur, CA Netto e ATS Wyse. Vitamin D(3) Reverses the Hippocampal Cytoskeleton Imbalance But Not Memory Deficits Caused by Ovariectomy in Adult Wistar Rats. *Neuromolecular Med.* 2017; 19: (2-3): 345-56.

Sitta A, GS Ribas, CP Mescka, AG Barschak, M Wajner e CR Vargas. Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress. *Cell Mol Neurobiol.* 2014; 34: (2): 157-65.

Smith QR, S Momma, M Aoyagi e SI Rapoport. Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J Neurochem.* 1987; 49: (5): 1651-8.

Snyderman SE. The Therapy of Maple Syrup Urine Disease. *American Journal of Diseases of Children.* 1967; 113: (1): 68-73.

Sperringer JE, A Addington e SM Hutson. Branched-Chain Amino Acids and Brain Metabolism. *Neurochem Res.* 2017; 42: (6): 1697-709.

Strauss KA, VJ Carson, K Soltys, ME Young, LE Bowser, EG Puffenberger, KW Brigatti, KB Williams, DL Robinson, C Hendrickson, K Beiler, CM Taylor, B Haas-Givler, S Chopko, J Hailey, ER Muelly, DA Shellmer, Z Radcliff, A Rodrigues, K Loeven, AD Heaps, GV

Mazariegos e DH Morton. Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase deficiency (maple syrup urine disease): Treatment, biomarkers, and outcomes. *Mol Genet Metab.* 2020; 129: (3): 193-206.

Strauss KA e DH Morton. Branched-chain Ketoacyl Dehydrogenase Deficiency: Maple Syrup Disease. *Curr Treat Options Neurol.* 2003; 5: (4): 329-41.

Strauss KA, EG Puffenberger e VJ Carson. Maple Syrup Urine Disease. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM et al. Book title. Seattle (WA): University of Washington, Seattle Copyright © 1993-2022, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.

Strauss KA, B Wardley, D Robinson, C Hendrickson, NL Rider, EG Puffenberger, D Shellmer, AB Moser e DH Morton. Classical maple syrup urine disease and brain development: principles of management and formula design. *Mol Genet Metab.* 2010; 99: (4): 333-45.

Taschetto L, G Scaini, HG Zapelini, C Ramos Â, G Strapazzon, VM Andrade, GZ Réus, M Michels, F Dal-Pizzol, J Quevedo, PF Schuck, GC Ferreira e EL Streck. Acute and long-term effects of intracerebroventricular administration of α -ketoisocaproic acid on oxidative stress parameters and cognitive and noncognitive behaviors. *Metab Brain Dis.* 2017; 32: (5): 1507-18.

Tavares RG, CE Santos, CI Tasca, M Wajner, DO Souza e CS Dutra-Filho. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *J Neurol Sci.* 2000; 181: (1-2): 44-9.

Treacy E, CL Clow, TR Reade, D Chitayat, OA Mamer e CR Scriver. Maple syrup urine disease: interrelations between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination. *J Inherit Metab Dis.* 1992; 15: (1): 121-35.

Van Rijt WJ, GD Koolhaas, J Bekhof, MR Heiner Fokkema, TJ De Koning, G Visser, PC Schielen, FJ Van Spronsen e TG Derks. Inborn Errors of Metabolism That Cause Sudden Infant Death: A Systematic Review with Implications for Population Neonatal Screening Programmes. *Neonatology.* 2016; 109: (4): 297-302.

Vieira TA, FB Trapp, CFM Souza, LS Faccini, LB Jardim, IVD Schwartz, M Riegel, CR Vargas, MG Burin, S Leistner-Segal, P Ashton-Prolla e R Giugliani. Information and Diagnosis Networks - tools to improve diagnosis and treatment for patients with rare genetic diseases. *Genet Mol Biol.* 2019; 42: (1 suppl 1): 155-64.

Vilela TC, G Scaini, CB Furlanetto, MA Pasquali, JP Santos, DP Gelain, JC Moreira, PF Schuck, GC Ferreira e EL Streck. Apoptotic signaling pathways induced by acute administration of branched-chain amino acids in an animal model of maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis.* 2017; 32: (1): 115-22.

Wajner M, AG Barschak, AP Luft, R Pires, E Grillo, A Lohr, C Funayama, MT Sanseverino, R Giugliani e CR Vargas. Acidúrias orgânicas: diagnóstico em pacientes de alto risco no Brasil. *Jornal de Pediatria.* 2001; 77:

Wajner M, DM Coelho, AG Barschak, PR Araújo, RF Pires, FL Lulhier e CR Vargas. Reduction of large neutral amino acid concentrations in plasma and CSF of patients with maple syrup urine disease during crises. *J Inherit Metab Dis.* 2000; 23: (5): 505-12.

Wajner M, A Latini, ATS Wyse e CS Dutra-Filho. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: Insights from animal studies. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 2004; 27: (4): 427-48.

Walterfang M, O Bonnot, R Mocellin e D Velakoulis. The neuropsychiatry of inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2013; 36: (4): 687-702.

Waters D, D Adeloje, D Woolham, E Wastnedge, S Patel e I Rudan. Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: a systematic analysis of the evidence. *J Glob Health.* 2018; 8: (2): 021102.

Wendel U e H Ogier De Baulny. Branched-Chain Organic Acidurias/Acidemias. In: Fernandes J, Saudubray J-M, van den Berghe G e Walter JH. Book title. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. 245-62.

Wessler LB, HR Farias, JF Ronsani, G Candioto, PCL Dos Santos, J De Oliveira, EP Rico e EL Streck. Acute exposure to leucine modifies behavioral parameters and cholinergic activity in zebrafish. *Int J Dev Neurosci.* 2019; 78: 222-6.

Wessler LB, K Ise, IC Lemos, VL Rezende, MB Duarte, AP Damiani, J De Oliveira, VM De Andrade e EL Streck. Melatonin ameliorates oxidative stress and DNA damage of rats subjected to a chemically induced chronic model of Maple Syrup Urine Disease. *Metab Brain Dis.* 2020; 35: (6): 905-14.

Westall RG, J Dancis e S Miller (1957). Maple sugar urine disease. *AMA JOURNAL OF DISEASES OF CHILDREN, AMER MEDICAL ASSOC 515 N STATE ST, CHICAGO, IL 60610.*

Winek K, H Soreq e A Meisel. Regulators of cholinergic signaling in disorders of the central nervous system. *J Neurochem.* 2021; 158: (6): 1425-38.

Yeaman SJ. The mammalian 2-oxoacid dehydrogenases: a complex family. *Trends in Biochemical Sciences.* 1986; 11: (7): 293-6.

Yudkoff M, Y Daikhin, I Nissim, O Horyn, B Luhovyy, B Luhovyy, A Lazarow e I Nissim. Brain amino acid requirements and toxicity: the example of leucine. *J Nutr.* 2005; 135: (6 Suppl): 1531s-8s.

Yuwiler A e E Geller. Serotonin depletion by dietary leucine. *Nature.* 1965; 208: (5005): 83-4.

Zhang C, P Zhou e T Yuan. The cholinergic system in the cerebellum: from structure to function. *Rev Neurosci.* 2016; 27: (8): 769-76.

Zielke HR, Y Huang, JT Tildon, CL Zielke e PJ Baab. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: alpha-ketoisocaproate infusion. *Dev Neurosci*. 1996; 18: (5-6): 420-5.

Zinnanti WJ, J Lazovic, K Griffin, KJ Skvorak, HS Paul, GE Homanics, MC Bewley, KC Cheng, KF Lanoue e JM Flanagan. Dual mechanism of brain injury and novel treatment strategy in maple syrup urine disease. *Brain*. 2009; 132: (Pt 4): 903-18.

ANEXOS



**Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais**



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **22/02/2022**.

Título do projeto	Efeitos da vitamina D sob comportamento, na inflamação, metabolismo e estresse oxidativo na doença da urina do xarope do bordo em um modelo animal.
Project title	Acute effects of vitamin D on behavior, inflammation, metabolism and oxidative stress on maple syrup urine disease in animal model
Número do protocolo Protocol number	61/2021 adendo
Pesquisador principal Principal Investigator	Emilio Luiz Streck
Pesquisadores Researchers	Alex Paulo Zeferino Padilha, Beatriz da Costa Chade, Caion Alves Rodrigues, Carolina Giassi Alano, Catharina de Bem Ribeiro, Isabela da Silva Lemos, Isabela Corrêa de Oliveira, Julia dos Santos Fragnani, Karoline Teixeira Fermo, Lara Resendes Cichella, Larissa Raupp Maciel, Laura Schmitt Quinsani, Laura Uggioni Elibio, Maria Eduarda Mendes Botelho, Monique Cardoso André, Natália Maciel Andrade, Nicolay Serafim Martinello, Rafael Orestes Canarim, Rafaela Tezza Matiola, Rejane de Figueiredo Seldenreich, Thiago Amorim Cunha do Nascimento.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/08/2021 a 25/08/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	7 dias / 20g
Número de animais	Masculino 136
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Josiane Budni
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 22 de fevereiro de 2022.